

Tierexperimentelle Untersuchungen zur Etablierung eines Modells des Ifosfamid- induzierten Fanconi-Syndroms

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades doctor
medicinae dentariae (Dr. med. dent.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät der
Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Tobias Werner

geboren am 23.06.1976 in Zittau

Gutachter:

1. Prof. Dr. C. Fleck, Jena
2. Prof. Dr. J. Misselwitz, Jena
3. PD Dr. L. Patzer, Halle

Tag der öffentlichen Verteidigung: 07.10.2008

Für Franziska und unseren Sohn Emil

Abkürzungsverzeichnis

2 β -TH	Testosteronhydroxylase
4-OH-IFO	4-Hydroxy-Ifosfamid
A	Enzymaktivität
a.d.	destilliertes Wasser
ADH	Antidiuretisches Hormon
AEC-Chromogen	Aminoethylcarbazol-Chromogen
CAA	Chloroacetaldehyd
C _{Krea(S)} bzw. (U)	Kreatininkonzentration im Serum bzw. im Urin
Cl _{Krea}	Kreatininclearance
CYP	Cytochrom P 450
ECOD	7-Ethoxycoumarin-O-Deethylierung
EMND	Ethylmorphin-N-Demethylierung
EROD	7-Ethoxyresorufin-O-Deethylierung
GFR	glomeruläre Filtrationsrate
GLDH	Glutamatdehydrogenase
GSH	Glutathion
Han:Wist	Hannover-Wistar
HE	Hämatoxylin-Eosin
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IFO	Ifosfamid
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
KOF	Körperoberfläche
KG	Körpergewicht
MESNA	2-Mercaptoethansulfonsäure-Natrium
MG	Molekulargewicht
n	Anzahl
NADPH	Nikotinamidadenosindinukleotidphosphat
NADH	Nikotinamidadenosindinukleotid
PAS	Perjodsäure-Schiff
PBS	Phosphatpuffer (phosphate buffered saline)

PNPH	p-Nitrophenol-Hydroxylierung
PROD	7-Pentoxyresorufin-O-Demethylierung
Prot	Protein
RSA	Rinderserumalbumin
SGLT1 bzw. 2	sodium-glucose-cotransporter
TCA	Trichloressigsäure
VF	Verdünnungsfaktor
$V_{(U)}$	Harnvolumen
ΔF	Differenz der Fluoreszenzen
ΔE	Differenz der Extinktionen

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	1
1.1. FANCONI-SYNDROM (FS)	1
1.2. IFOSFAMID (IFO)	2
1.3. IFO-INDUZIERTER NEPHROTOXIZITÄT	4
1.4. TIERMODELLE ZUR ERZEUGUNG EINER TUBULÄREN NEPHROPATHIE	6
1.5. PARAMETER ZUR DIAGNOSTIK EINES FANCONI-SYNDROMS	7
1.5.1. Körper- und Organgewichte	8
1.5.2. Harnvolumen	8
1.5.3. Kreatininclearance	9
1.5.4. Renale Proteinausscheidung	9
1.5.5. Renale Natriumausscheidung	10
1.5.6. Renale Kaliumausscheidung	11
1.5.7. Renale Phosphatausscheidung	12
1.5.8. Renale Glukoseausscheidung	12
1.6. BIOTRANSFORMATION	13
1.7. MORPHOLOGIE	14
1.8. HUNGERDYSTROPHIE NACH IFO-THERAPIE	15
1.8.1. Gewichtsentwicklung	15
1.8.2. Harnvolumen und Ausscheidung von Elektrolyten	16
1.8.3. Stoffwechsel	17
2. ZIEL DER ARBEIT	18
3. MATERIAL UND METHODEN	19
3.1. VERSUCHSTIERE	19
3.2. VERSUCHSANORDNUNG	19
3.3. VERSUCHSDURCHFÜHRUNG	20
3.4. BESTIMMUNGSMETHODEN	21
3.4.1. Bestimmung des Körpergewichts	21
3.4.2. Bestimmung des Harnvolumens	21

3.4.3. Konzentrationsbestimmung in Harn und Serum	21
3.4.3.1. Kreatinin	21
3.4.3.2. Gesamteiweiß	22
3.4.3.3. Albumin	22
3.4.3.4. Natrium	22
3.4.3.5. Kalium	23
3.4.3.6. Phosphat	23
3.4.3.7. Glukose	23
3.4.4. Modellreaktionen zur Charakterisierung verschiedener Cytochrom P450-Isoenzyme	24
3.4.4.1. 7-Ethoxyresorufin-O-Deethylierung (EROD)	24
3.4.4.2. 7-Pentoxyresorufin-O-Demethylierung (PROD)	25
3.4.4.3. 7-Ethoxycoumarin-O-Deethylierung (ECOD)	25
3.4.4.4. p-Nitrophenol-Hydroxylierung (PNPH)	26
3.4.4.5. Ethylmorphin-N-Demethylierung (EMND)	27
3.4.4.6. Testosteron-Hydroxylase (2 β -TH)	28
3.4.5. Morphologie	30
3.4.5.1. Herstellung der Gewebeschnitte	30
3.4.5.2. Immunhistochemie	30
3.4.5.3. Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung	31
3.4.5.4. Perjodsäure-Schiff (PAS) – Färbung	32
3.5. STATISTIK	32
4. ERGEBNISSE	33
4.1. VERSUCHSREIHE 1: 60 TAGE ALTE WEIBLICHE RATTEN	33
4.1.1. Körpergewichtsentwicklung	33
4.1.2. Harnvolumen	34
4.1.3. Kreatininclearance	34
4.1.4. Proteinausscheidung	35
4.1.5. Albuminausscheidung	35
4.1.6. Natriumausscheidung	36
4.1.7. Kaliumausscheidung	37
4.1.8. Phosphatausscheidung	37
4.1.9. Glukoseausscheidung	39

4.2. VERSUCHSREIHE 2: 20 TAGE ALTE WEIBLICHE RATTEN	39
4.2.1. Körpergewichtsentwicklung	40
4.2.2. Harnvolumen	40
4.2.3. Kreatininclearance	41
4.2.4. Proteinausscheidung	41
4.2.5. Natriumausscheidung	42
4.2.6. Kaliumausscheidung	42
4.2.7. Phosphatausscheidung	43
4.2.8. Glukoseausscheidung	44
4.3. VERSUCHSREIHE 3: 30 TAGE ALTE MÄNNLICHE RATTEN	45
4.3.1. Körpergewichtsentwicklung	45
4.3.2. Parameter der Nierenfunktion	46
4.3.3. Einfluss auf die Biotransformation	47
4.3.4. Histopathologische Ergebnisse	48
5. DISKUSSION	55
5.1. TIERMODELLE ZUR ERZEUGUNG EINES FANCONI-SYNDROMS	56
5.2. ALTERSABHÄNGIGKEIT DER NEPHROTOXIZITÄT VON IFO	58
5.3. AUSWIRKUNG VON IFO AUF DIE BIOTRANSFORMATION DER RATTE	60
5.4. IFO-INDUZIERTER HUNGERDYSTROPHIE	61
5.4.1. Körper- und Organgewichte	62
5.4.2. Harnvolumen	63
5.4.3. Harninhaltsstoffe	63
5.4.4. Biotransformation	64
5.4.5. Morphologie	65
5.4.6. Schlussfolgerung	67
6. ZUSAMMENFASSUNG	68
7. LITERATURVERZEICHNIS	71
8. ANHANG	89
8.1. DANKSAGUNG	89
8.2. LEBENSLAUF	90
8.3. EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	91

1. Einleitung

1.1. Fanconi-Syndrom (FS)

In den 30er Jahren des 20. Jahrhundert beschrieben deToni, Debré und Fanconi unabhängig voneinander erstmals das klinische Bild einer renalen Tubulopathie verbunden mit Vitamin D-resistenter Rachitis und Glukosurie (Fanconi 1931, DeToni 1933, Debré et al. 1934). McCune et al. (1943) wiesen bei diesem Krankheitsbild zusätzlich eine Hyperaminoazidurie nach. Sie schlugen für diesen Symptomkomplex den Namen „Fanconi-Syndrom“ vor.

Heutzutage wird das FS als generalisierte Störung der renal tubulären Reabsorption ohne primär glomeruläre Ursache definiert (Patzner 2003). Es ist durch Polyurie und den renalen Verlust von Proteinen, Natrium, Kalium, Kalzium, Phosphat, Glukose, Bikarbonat, Aminosäuren, organischen Säuren sowie Carnitin gekennzeichnet. Die am FS erkrankten Patienten können daraufhin Kleinwuchs, Azidose und Vitamin D-resistente Rachitis bzw. Osteomalazie und Osteoporose entwickeln (Zielinska und Bodalski 2001).

Das FS kann als hereditäre Erkrankung auftreten. Häufiger ist allerdings das medikamenteninduzierte FS, ausgelöst durch Antibiotika, Antikonvulsiva und Zytostatika wie zum Beispiel Ifosfamid (IFO), einem Oxazaphosphorinderivat (Garcia 1995, Izzedine et al. 2003).

Die Ausprägung des klinischen Bildes unterliegt verschiedenen Schweregraden. Das erworbene FS kann durch die Elimination der Noxen und durch gute diätetische Einstellung gelindert werden, ist aber häufig irreversibel. Histologisch kann das Zytoplasma des proximalen Tubulus der Niere durch Vakuolisierung, Schwellung der Mitochondrien und des endoplasmatischen Retikulums sowie eine generalisierte Störung der zytoplasmatischen Organisation imponieren (McLeese et al. 1996). Häufig werden jedoch keine histologischen Veränderungen festgestellt (Wyss et al. 1992).

Welche pathophysiologischen Mechanismen der Nierenfunktionsstörung zugrunde liegen ist derzeit noch unklar. Verschiedene Ursachen der verringerten Reabsorption von Harninhaltsstoffen aus dem Ultrafiltrat werden diskutiert:

- eine verminderte Funktion von Transportproteinen, welche die Reabsorption von luminalen Substanzen aus dem Ultrafiltrat vermitteln,

Einleitung

- eine verminderte ATP-Produktion mit konsekutiver Funktionsstörung der Na^+/K^+ -ATPase und ein dadurch verminderter Na^+ -Gradient, der für die Reabsorption der meisten Substrate verantwortlich ist bzw.
- ein vermehrter parazellulärer bzw. transmembranaler Substrat-Fluss zurück ins Lumen (Patzner 2003).

Durch verschiedene Versuchsmodelle kann ein FS ausgelöst werden. Foreman et al. (1987) beobachteten nach Applikation von Cystindimethylester ein ansteigendes Harnvolumen sowie vermehrte renale Phosphat-, Glukose- und Aminosäureausscheidung. Die Kreatininclearance blieb dabei unverändert. Intraperitoneal injiziertes Succinylaceton führte zu Glukosurie, Aminoazidurie, Polyurie und Phosphaturie. Auch hier konnte keine Veränderung der Kreatininclearance festgestellt werden (Wyss et al. 1992). Dubourg et al. (2002) und Benesic et al. (2005) untersuchten die Wirkung von Chloracetaldehyd (CAA), einem der nephrotoxischen Metabolite von IFO, auf Tubuluszellen. Hierbei wurde nach Abfall der intrazellulären ATP-Konzentration eine Störung der Kalziumbilanz beobachtet. Nissim und Weinberg (1996) untersuchten die Wirkung von Maleinsäure auf die Nierenfunktion von Ratten. Dabei wurde ein FS induziert, welches durch den renalen Verlust von Aminosäuren, organische Säuren, Glukose und Elektrolyten gekennzeichnet war.

1.2. Ifosfamide (IFO)

Das Oxazaphosphorinderivat Ifosfamid wurde Mitte der sechziger Jahre des 20. Jahrhunderts entwickelt und seit den frühen 70er Jahren zur Behandlung von Osteosarkomen, Rhabdomyosarkomen, Retinoblastomen, Neuroblastomen, Lymphomen, rezidivierenden soliden Tumoren, Hirntumoren und akuten lymphatischen Leukämien eingesetzt (Pratt 1992, Kerbusch et al. 2001). Es wird empfohlen, bei fraktionierter Applikation Dosierungen von 5-6mg IFO/100g KG i.v. einmal an fünf aufeinanderfolgenden Tagen anzuwenden. Eine andere mögliche Applikationsform ist die intraarterielle 24-Stunden-Infusion von 12,5mg IFO/100g KG. IFO ist ein Prodrug und entfaltet seine Wirkung erst nach Entstehung reaktiver Metabolite. Für den Metabolismus von IFO spielt das Cytochrom P450-System eine entscheidende Rolle. Durch Hydroxylierung entsteht 4-Hydroxy-Ifosfamid (4-OH-IFO), welches sich im Gleichgewicht mit Aldo-IFO befindet. Dieses reagiert unter

Einleitung

Abspaltung von Acrolein zu der eigentlichen Wirksubstanz IFO-Mustard (Sladek 1988). Die Deaktivierung ist ein weiterer Weg der Metabolisierung und besteht in der Seitenkettenoxidation zu 2- bzw. 3-Dechloroethyl-IFO (Norpoth 1976). Dabei entsteht Chloracetaldehyd (CAA), welches für das Entstehen der IFO-induzierten Nephropathie (s.u.) verantwortlich gemacht wird (Dubourgh et al. 2001, Aleksa et al. 2004b, Benesic et al. 2005).

Der Metabolismus von IFO unterliegt der Autoinduktion, welche innerhalb von 24 Stunden nach Beginn der Behandlung einsetzt. Dabei sind die genauen Mechanismen noch nicht bekannt. Beobachtet wurde eine zeitlich zunehmende Clearance nach IFO-Gabe (Kerbusch et al. 2001). Unklarheit herrscht noch darüber, welche CYP-Isoformen den Stoffwechsel vermitteln. An Ratten wird die Biotransformation von IFO durch die CYP-Isoformen 3A und 2B vermittelt (Brain et al. 1998, Crommentuyn et al. 1998). Allerdings unterscheiden sich die Isoenzyme der Versuchstiere deutlich von den menschlichen. Am Menschen wurde in vivo sowohl für die Hydroxylierung (Aktivierung) als auch für die Dechloroethylierung (Deaktivierung) das Cytochrom-Isoenzym 3A4 als wichtigste Isoform gefunden (Roy et al. 1999a). Auch CYP2B6 und 2B1 wurden an menschlichen Leberzellen bei der Umsetzung von IFO in vitro nachgewiesen (Chen et al. 1996, Roy et al. 1999b).

Die chemotherapeutische Wirkung von IFO wird maßgeblich durch den alkylierenden Metaboliten IFO-Mustard verursacht. Dieses Molekül besitzt zwei Chlorethylgruppen. Eine befindet sich innerhalb und eine außerhalb des aromatischen Oxazaphosphorinringes. Der Abstand dieser funktionellen Gruppen untereinander verleiht IFO seine höhere zytotoxische Potenz gegenüber seinem Strukturisomer Cyclophosphamid (Kerbusch et al. 2001). Die zwei Chlorethylgruppen werden intrazellulär zu Alkylgruppen umgewandelt und reagieren mit den nukleophilen Domänen der DNA-Basen. Aufgrund der Verbindung von zwei Alkylgruppen eines Moleküls mit zwei DNA-Basen kann eine Vernetzung innerhalb eines DNA-Stranges bzw. crosslinks zwischen zwei Strängen entstehen (Dong et al. 1995). Letzteres verhindert die DNA-Replikation vor der Zellteilung. Da Tumorzellen im Vergleich zu gesunden Zellen durch eine höhere Mitoserate gekennzeichnet sind, werden diese besonders durch die Zytotoxizität von IFO-Mustard beeinträchtigt (Kerbusch et al. 2001).

Die Dosis wurde bis zum zusätzlichen Einsatz von MESNA durch die Urotoxizität (hämorrhagische Zystitis) limitiert (Kerbusch et al. 2001). Heute ist der klinische

Nutzen von IFO durch Nierenfunktionsstörungen sowie durch unspezifische Nebenwirkungen wie Anorexie, Übelkeit, Erbrechen, Alopezie, Granulozytopenie, Thrombozytopenie, Hepatitis und Kardiotoxizität (Arrhythmien, Hypertonie, Myokarditis, Perikarditis) begrenzt. In einer prospektiven Studie, welche an 21 Jugendlichen durchgeführt wurde (Loss et al. 2004), waren Bluterkrankungen wie Neutropenie (82%), Thrombozytopenie (73%) und Anämie (61%) die am häufigsten auftretenden Nebenwirkungen. Da IFO die Blut-Hirnschranke passiert, können auch Enzephalopathien und Neuropathien auftreten (Klastersky 2003, Nicolao und Giometto 2003).

1.3. IFO-induzierte Nephrotoxizität

Das FS ist eine Langzeitkomplikation, welche nach IFO-Gabe in 1-5% der Fälle auftritt (Loebstein und Koren 1998, Rossi et al. 1999, Patzer et al. 2001, Langer et al. 2004). Vergleichsweise häufig werden hingegen akute subklinische Nephropathien beobachtet, die sich in einer Störung der Phosphatreabsorption präsentieren und in der Mehrheit der Fälle reversibel sind. Häufig gehen sie jedoch einem FS voraus. 20-30% der mit IFO behandelten Patienten erkranken an solch einer proximal tubulären Funktionsstörung (Skinner et al. 1993, English et al. 1997, Langer et al. 2004).

Das IFO-induzierte FS tritt häufig Monate bis Jahre nach Beendigung der Tumorthherapie auf (Moncrieff und Foot 1989, Negro et al. 1998), kann sich aber auch im engen zeitlichen Zusammenhang mit der IFO-Applikation etablieren (Heney et al. 1989). Rossi et al. (1999) stellten nach Abschluss einer IFO-Therapie eine schwere Aminoazidurie bei 28% und eine gesteigerte Phosphatausscheidung bei 17% der Patienten innerhalb eines Jahres fest. 6% entwickelten ein FS, bei 9% der Patienten wurde eine subklinische Tubulopathie diagnostiziert. Garcia (1995) fand bei einem 20 Jahre alten männlichen Patienten drei Monate nach IFO-Behandlung eine Polyurie sowie eine gesteigerte renale Ausscheidung von Phosphat, Kalium und Protein. Bei IFO-behandelten Kindern wurde 10 Jahre nach Beendigung einer IFO-Therapie beobachtet, dass sich eine unmittelbar nach IFO-Applikation aufgetretene tubuläre Dysfunktionen bei manchen Patienten besserte, bei anderen hingegen verschlechterte (Skinner 2003).

Die IFO-induzierte Nephropathie betrifft alle Segmente des Nephrons, am häufigsten jedoch den proximalen Tubulus. Dieses Krankheitsbild ist

Einleitung

charakterisiert durch einen Anstieg der Serumkreatininkonzentration und den renalen Verlust von Glukose, Phosphate, Bikarbonat, Aminosäuren und Proteinen (Loebstein et al. 1999) Insbesondere nach Anwendung hoher Dosen kann aus dieser Erkrankung ein Nierenversagen resultieren (Berrak et al. 2005).

Die meisten Autoren gehen davon aus, dass Chloracetaldehyd (CAA), ein Stoffwechselprodukt von IFO, für die Nephrotoxizität verantwortlich ist (Dubourg et al. 2001, Aleksa et al. 2004b, Benesic et al. 2005). Risikofaktoren, welche zur Entwicklung einer Nephropathie beitragen, werden in der Literatur kontrovers diskutiert. Dabei gilt die wiederholte IFO-Applikation und steigende Gesamtdosis als hochprädictiv für die Entstehung eines FS (Lee et al. 2001). Allerdings ist unklar, oberhalb welcher Dosis das Risiko an FS zu erkranken erhöht ist. Loebstein und Koren (1998) erklären sowohl für das Entstehen als auch für die Schwere der nephrotoxischen Schädigung eine Gesamtdosis von $>60\text{g IFO/m}^2$ Körperoberfläche (KOF) als einzigen unabhängigen Risikofaktor. Skinner et al. (1996) empfehlen, eine Gesamtdosis von $>100\text{g IFO/m}^2$ KOF zu vermeiden.

Bezüglich der Bedeutung des Patientenalters als Risikofaktor eines FS gehen die Meinungen der Autoren weit auseinander. McCune et al. (2004) beobachteten nach Gabe vergleichbarer Gesamtdosen bei Erwachsenen eine ähnliche Inzidenz der IFO-induzierten Nephropathie wie bei Kindern bzw. Jugendlichen bis zu einem Alter von 18 Jahren. Auch Skinner et al. (2000) fanden an 148 Kindern und Jugendlichen mit verschiedenen Sarkomen keinen Zusammenhang zwischen Patientenalter und dem Ausmaß der Nierenfunktionsstörung nach IFO-Therapie. Andere Resultate erzielten Loebstein et al. (1999), bei welchen sich 174 Kinder nach Abschluss einer IFO-Therapie über einen Gesamtzeitraum von fünf Jahren in der Nachsorge befanden. Die Kinder wurden je nach Schwere der entwickelten Nephropathien in vier Gruppen (keine, leichte, moderate, schwere glomeruläre bzw. tubuläre Dysfunktion) eingeteilt. Dabei wurde festgestellt, dass in der Gruppe der schweren Nierenerkrankung das Alter der Patienten signifikant niedriger war als in den übrigen Gruppen. Diese Studie gelangte zu der Empfehlung, Kinder in einem Alter von weniger als drei Jahren mit einer Gesamtdosis von weniger als 45g IFO/m^2 KOF zu behandeln. Aleksa et al. (2001) unterzogen die Studien von Skinner et al. (2000) und Loebstein et al. (1999) in einer Übersichtsarbeit einer kritischen Bewertung. Danach können die gegensätzlichen Ergebnisse auf Unterschiede in der Patientenzahl, der Länge des Beobachtungszeitraumes sowie auf begleitende Cisplatinmedikation zurückgeführt

werden. Des weiteren wurden verschiedene Parameter zur Identifikation der Nierendysfunktion hinzugezogen, was die Vergleichbarkeit beider Studien erschwert. Einstimmig wird das Risiko für die Entwicklung eines FS bei zusätzlicher Gabe von Cisplatin (Loebstein und Koren 1998, Lee et al. 2001), nach unilateraler Nephrektomie (Loebstein und Koren 1998) sowie bei vorrangegangener Bestrahlung des Retroperitonealraumes (Loebstein et al. 1999) als erhöht beurteilt.

Die unterschiedliche Anfälligkeit von Patienten auf die nierenschädigende Wirkung von IFO begründet sich wahrscheinlich auf eine interindividuell abweichende Biotransformationskapazität. Genpolymorphismen für die Codierung verschiedener CYP 450-Isoenzyme, Aldehyddehydrogenasen bzw. Glutathion-S-Transferasen spielen eine wichtige Rolle in der unterschiedlichen Empfindlichkeit von Patienten gegenüber der nephrotoxischen Wirkung von IFO (Zhou et al. 2007).

1.4. Tiermodelle zur Erzeugung einer tubulären Nephropathie

Der Mechanismus, welcher zu einer IFO-induzierten Nierenschädigung führt, ist noch nicht vollständig geklärt. Nach Behandlung von Wistarratten durch Sener et al. (2004) wurde beobachtet, dass FS-artige Symptome wie der renale Verlust von Natrium, Phosphat und Glukose mit einer reduzierten intrazellulären Glutathion (GSH)-konzentration einhergingen. Glutathion ist für den Schutz von Zellen vor der oxidativen Wirkung von Radikalen verantwortlich. 4-OH-IFO wirkt reduzierend auf die GSH-Aktivität in den Zellen der Immunabwehr (Kuppner et al. 2003).

T-Zellen und natürliche Killerzellen werden durch dendritische Zellen aktiviert, welche unter dem Einfluss von IFO die Fähigkeit zur Stimulation der T-Zellproliferation sowie der Interferon γ (IFN- γ)-Produktion verlieren.

Wahrscheinlich senkt Chloracetaldehyd (CAA) den intrazellulären ATP-Spiegel im Epithel der Nierentubuli, wodurch eine reduzierte Na^+/K^+ -ATPase-Aktivität zu beobachten ist. Der daraus resultierende verringerte Na^+ -Gradient zwischen Tubuluslumen und Tubuluszelle kann für eine verringerte Reabsorptionsleistung des Nephrons verantwortlich sein (Castano et al. 1997, Dubourg et al. 2001, Sener et al. 2004).

Ein weiterer Ansatz zur Klärung der nephrotoxischen Wirkung von IFO-Metaboliten bieten Benesic et al. (2005), welche CAA für die Störung der Kalziumbalance

zwischen Tubuluszelle und Tubuluslumen durch Hemmung des Na^+/Ca^+ -Austausches verantwortlich machen.

In der Literatur existiert eine Vielzahl an Versuchsmodellen zur Entwicklung eines FS bzw. von FS-artigen Symptomen ausgelöst durch IFO, aber auch durch andere Stoffe. Nach Applikation von Maleat ist bei Ratten der Na^+ -abhängige Alanin- und Glukosetransport in der Bürstensaummembran und die Menge an Hitzeschockproteinen (Hsp60) beeinträchtigt. Eine verringerte Na^+/K^+ -ATPase-Aktivität wird in der Nierenrinde beobachtet (Castano et al. 1997). Auch Nissim und Weinberg (1996) induzierten durch Maleinsäure ein FS bzw. FS-artige Symptome mit renalem Verlust von Aminosäuren, organischen Säuren, Glukose und Elektrolyten. Zusätzlich stellten sie einen verringerten intrazellulären Spiegel von ATP, GSH und Glycin fest. Weitere Stoffe mit Potenz zur Auslösung eines FS bzw. von FS-artigen Symptomen sind Blei (Nolan und Shaikh 1992), Cadmium (Gonick et al. 1980), Succinylaceton (Roth et al. 1989, Wyss et al. 1992) und Cystindimethylester (Foreman et al. 1987). Da bei diesen Modellen allerdings die Versuchstiere kurz nach den IFO-Applikationen getötet wurden, ist davon auszugehen, dass es sich hierbei um akute Nephropathien und nicht um die Langzeitentwicklung im Sinne eines FS handelt.

Ziel unserer Arbeit ist es, ein Schädigungsmodell mit IFO als FS-auslösendem Agens zu entwickeln. Da in der Literatur lediglich Untersuchungen zur akuten IFO-Wirkung existieren (Springate und Van Liew 1995, Badary 1999a, Sener et al. 2004), soll in unseren Studien ein Langzeitmodell zum IFO-induzierten FS entwickelt werden.

1.5. Parameter zur Diagnostik eines Fanconi-Syndroms

Die Beobachtung der Körpergewichtsentwicklung, die Bestimmung des Harnvolumens, Urin- und Serumanalytik sowie histologische Untersuchungen der Niere lassen Aussagen über die IFO-Wirkung zu und geben Hinweise auf Nierenfunktionsstörungen. Zusätzliche Untersuchungen der Biotransformationsleistung der Leber können Hinweise darauf geben, ob eine wiederholte IFO-Gabe die Leberfunktion beeinträchtigt.

1.5.1. Körper- und Organgewichte

Ein FS ist bei jungen, im Wachstum befindlichen Patienten unter anderem durch Kleinwuchs gekennzeichnet (Zielinska und Bodalski 2001, Patzer 2003). Durch Aminoazidurie, Glukosurie und den renalen Verlust von Elektrolyten (Natrium, Kalium, Phosphat) werden Stoffe ausgeschieden, welche insbesondere bei Kindern und Jugendlichen für Wachstumsprozesse benötigt werden. Die Entwicklung des Körpergewichts chemotherapeutisch behandelter Patienten reflektiert häufig Allgemeinzustand, Appetit sowie gastro-enterale Nebenwirkungen. Eine Veränderung der Geschmacks- und Geruchswahrnehmung kann zu einer Anorexie führen (Khayat 2000, Argiles et al. 2006), wobei Leber und Niere analog der Körperentwicklung unter IFO-Einfluss Gewicht verlieren. In verschiedenen Arbeiten wurde beobachtet, dass IFO in Dosierungen von 4 bis 8 mg/100g KG eine verlangsamte Gewichtsentwicklung von Ratten induzierte (Springate und Van Liew 1995, Badary 1999b).

1.5.2. Harnvolumen

Beim Menschen werden glomerulär ca. 180 Liter Primärharn pro Tag gebildet. Durch Reabsorption und Sekretion wird dieses Ultrafiltrat jedoch stark sowohl in seiner Zusammensetzung als auch in Menge und Konzentration verändert. Letztlich gelangen nur etwa 1-2 Liter Endharn zur Ausscheidung. Dabei kommt der Niere eine entscheidende Aufgabe in der Regulation des Wasserhaushaltes zu (Jockenhövel 1997). Veränderungen des Harnvolumens weisen oftmals auf eine Nierenschädigung hin. Anurie, Oligurie oder Polyurie geben wichtige diagnostische Hinweise auf systemische oder renale Erkrankungen. Polyurie tritt bei FS-Patienten im Zusammenhang mit renalem Elektrolytverlust, speziell einer verstärkten Natriurese, auf. Beim Nierengesunden wird durch eine gesteigerte Harnausscheidung und konsekutive Hypovolämie eine vermehrte Renin- und ADH-Freisetzung eingeleitet. Renin wird in den myoepithelialen Zellen des Vas afferens gebildet und bei fallendem Blutdruck freigesetzt. In der darauf folgenden Enzymkaskade wird über mehrere Zwischenprodukte Angiotensin II gebildet, welches Vasokonstriktion auslöst und die Aldosteronfreisetzung stimuliert (Lang und Fromm 2000). Durch die stimulierende Wirkung von Aldosteron auf die Natriumresorption wird eine Oligurie ausgelöst und

somit der Blutdruck reguliert. ADH dagegen wird im Hypothalamus gebildet, im Hypophysenhinterlappen gespeichert und durch einen hyperosmotischen Reiz freigesetzt. In der Niere bewirkt ADH die Expression von Aquaporin 2 in apikalen Membranen der distalen Tubuluszellen und des Sammelrohres. Dadurch wird das Epithel für Wasser permeabel und es kann verstärkt rückresorbiert werden (Wuttke 2000). Wilke et al. (2005) beobachteten allerdings bei der Untersuchung hungernder Ratten eine ADH-unabhängige, verstärkte Expression von Aquaporin 2, was in diesen Versuchen unter anderem zur Ausscheidung verringerter Harnmengen führte.

1.5.3. Kreatininclearance

Die Nierenfunktion lässt sich durch die Bestimmung der glomerulären Filtrationsrate (GFR) beurteilen. Sie wird durch die Berechnung der renalen Clearance verschiedener Markersubstanzen ermittelt. Die endogene Kreatininclearance dient als ausreichendes Maß zur Bestimmung der GFR. Kreatinin wird ständig in der Muskulatur gebildet, glomerulär filtriert und tubulär nur in sehr geringem Umfang reabsorbiert (Lang und Fromm 2000). Die GFR errechnet sich als Produkt aus der Kreatininkonzentration im Urin und dem Harnvolumen pro Minute, dividiert durch die Kreatininkonzentration im Serum. Die Serumkreatininkonzentration ist unter physiologischen Bedingungen weitgehend konstant, hängt allerdings von der gesamten Muskelmasse und deren Aktivität sowie von vorbestehenden Erkrankungen ab. Eine verringerte Kreatininclearance weist auf eine Nierenerkrankung mit herabgesetzter GFR hin (Lang und Fromm 2000). Die Kreatininclearance beträgt beim nierengesunden Erwachsenen ca. 90-120 ml/min (Jockenhövel 1997). Bei der Ratte wurde eine durchschnittliche Kreatininclearance von 0,4 ml/100g KG x min errechnet (Hsu et al. 1999). Bei abnehmender GFR sinkt auch die renal ausgeschiedene Kreatininmenge. Eine erhöhte Serumkreatininkonzentration und damit eine verringerte Kreatininclearance wird durch die glomeruläre Beeinträchtigung bei akuten IFO-induzierten FS-artigen Symptomen beobachtet (Nissim und Weinberg 1996, Badary 1999a, 1999b).

1.5.4. Renale Proteinausscheidung

Pro Tag werden in der Niere bis zu 150 mg insbesondere niedermolekulare Proteine und Aminosäuren bei einem nierengesunden Erwachsenen filtriert und im proximalen

Tubulus größtenteils reabsorbiert (Ritz et al. 1984). Der glomeruläre Filter erschwert die Passage von Molekülen mit einer Größe von mehr als 50 kDa. Zusätzlich können negativ geladene Teilchen durch die negative Eigenladung des Filters diesen nur eingeschränkt passieren (Lang und Fromm 2000). Der Nachweis einer Proteinurie dient als nichtinvasiver und einfacher Marker zur Früherkennung sowie zur Verlaufskontrolle von Nierenerkrankungen. Die Eiweiße können je nach Größe in hoch- und niedermolekulare Serumproteine eingeteilt werden. Hierdurch wird neben einer renalen (glomerulären und tubulären sowie Mischformen) auch eine prä- und postrenale Proteinurie unterschieden (Hofmann et al. 2001). Bei Ratten tritt postnatal eine erhöhte Proteinausscheidung im Harn auf, welche sich bis zum 33. Tag normalisiert (Appenroth und Bräunlich 1986). Nach IFO-Applikation kommt es zur erhöhten renalen Proteinausscheidung bei Versuchsratten, was auf FS-artige Symptome mit akuter glomerulärer und tubulärer Schädigung hinweist (Springate und Van Liew 1995, Badary 1998).

1.5.5. Renale Natriumausscheidung

Natrium ist das mengenmäßig wichtigste Ion des Extrazellulärtraumes (Lang 2000). In der Niere findet die Regulation des Natriumhaushaltes statt, da 95% der gesamten Natriumausscheidung renal erfolgt. Der Natriumgehalt im Ultrafiltrat ist mit dem Serumnatriumgehalt identisch, allerdings wird davon nur 1% im Urin ausgeschieden. Der übrige Anteil wird im gesamten Nephron durch verschiedene Mechanismen reabsorbiert, wobei im proximalen Tubulus der größte Teil des Natriums wieder aufgenommen wird. Die basolaterale Na^+/K^+ -ATPase generiert durch den energieaufwendigen Austausch von intrazellulärem Natrium gegen extrazelluläres Kalium einen steilen elektrochemischen Gradienten zwischen Extrazellulärtraum und Lumen. 60-70% des Natriums aus dem Ultrafiltrat folgt diesem Gradienten in die Tubuluszelle, wo es durch die Na^+/K^+ -Pumpe der basolateralen Membran des Epithels ins Blut transportiert wird. Durch den „solvent drag“ wird weiteres Natrium durch die Schlussleisten des Tubulusepithels transportiert. In den weiter distal gelegenen Nephronabschnitten erfolgt die Natriumrückresorption gekoppelt an den Chloridtransport (aufsteigender Teil der Henleschleife) bzw. aktiv durch die Vermittlung von Aldosteron (distaler Tubulus). Die Regulation des Natriumhaushaltes wird durch mehrere Faktoren beeinflusst. Eingeschränkte Nierendurchblutung sowie

Natriummangel führen zu einer vermehrten Reninfreisetzung aus den Epitheloidzellen des juxtaglomerulären Apparates. Renin spaltet aus dem Angiotensinogen der Leber Angiotensin I ab, welches durch das ubiquitäre Angiotensin-Converting-Enzym (ACE) in Angiotensin II umgewandelt wird. Dieses physiologisch wirksame Oktapeptid wirkt als Vasokonstringens und fördert die renale Natriumresorption im distalen Tubulus und im Sammelrohr durch die Freisetzung von Aldosteron (Wuttke 2000). Ein weiterer regulatorischer Mechanismus ist der Gauer-Henry-Reflex, welcher bei einer Abnahme des Blutvolumens sowie einer Zunahme der Osmolarität zu einer verstärkten Ausschüttung von ADH aus der Neurohypophyse führt. ADH bewirkt über eine vermehrte Aquaporin 2-Expression im distalen Tubulus sowie im Sammelrohr eine vermehrte Wasserrücknahme aus dem Harn (Busse 2000).

Tierexperimentelle Untersuchungen brachten unterschiedliche Ergebnisse in der Wirkung von IFO auf die renale Natriumausscheidung, wobei die Na^+ -Sekretion durch IFO-Applikation gesteigert (Nissim und Weinberg 1996, Badary 1998 und 1999a, Sener et al. 2004) bzw. unbeeinträchtigt war (Springate und Van Liew 1995).

1.5.6. Renale Kaliumausscheidung

Kalium befindet sich zum überwiegenden Teil intrazellulär und wird im Extrazellulärraum nur in geringen Mengen nachgewiesen. Zur Erhaltung der Kaliumbalance wird der Niere eine entscheidende Rolle zugeschrieben. Nur 10% der Kaliumausscheidung erfolgt enteral. Kalium wird frei durch die glomeruläre Basalmembran filtriert und anschließend fast vollständig im proximalen Tubulus und im aufsteigenden Teil der Henleschleife resorbiert (Kuhlmann et al. 1979). Die Regulation des Kaliumbestandes erfolgt in den distalen Nephronabschnitten über Resorption durch die K^+/H^+ -ATPase bzw. durch Sekretion über luminale K^+ -Kanäle (Lang 2000). Wie bei der Natriumausscheidung waren die Ergebnisse bezüglich der Kaliumausscheidung nach IFO-Gabe bei verschiedenen Autoren unterschiedlich und wurden von erhöht (Nissim und Weinberg 1996, Badary 1998 und 1999a) bis unverändert (Springate und Van Liew 1995) beschrieben.

1.5.7. Renale Phosphatausscheidung

Die Phosphatbalance des Körpers wird durch enterale Phosphataufnahme, Knochenstoffwechsel und renale Ausscheidung gesteuert. Aufgrund der schnellen Reaktion auf kurzfristige Veränderungen des Phosphatgleichgewichtes kommt der Niere eine entscheidende Rolle in der Aufrechterhaltung der Phosphathomöostase zu. Phosphat wird frei glomerulär filtriert und proximal zu ca. zwei Dritteln reabsorbiert. Dabei ist die Wiederaufnahme an einen Natrium-Kotransport gekoppelt (Lang und Fromm 2000). Bisher wurden drei natriumabhängige Phosphattransportsysteme (NaPi-I, NaPi-II, NaPi-III) in der apikalen Zellmembran des proximalen Tubulus identifiziert (Werner et al. 1998).

Renaler Phosphatverlust ist das am häufigsten nachgewiesene Symptom bei FS-Patienten. Insbesondere der IFO-Metabolit CAA, aber auch 4-OH-IFO und IFO-Mustard führen in Abhängigkeit von Zeit und Konzentration zu einer Hemmung des Phosphattransports (Patzner 2003).

1.5.8. Renale Glukoseausscheidung

Nach Aufnahme und Spaltung von Poly- und Disacchariden bzw. nach Bildung durch Glukoneogenese und Glykogenabbau in der Leber, kommt der Glukose durch die aerobe und anaerobe Energiegewinnung eine wichtige Bedeutung zu. Aufgabe der Niere ist es, diesen Energieträger für den Organismus zurückzuhalten. Glukose wird beim Nierengesunden im Glomerulum frei filtriert und im proximalen Tubulus und in der Henleschleife vollständig reabsorbiert. Dabei wird der hohe Natriumgradient für den Symport in die Tubuluszelle genutzt. SGLT1 stellt ein hochaffines aber unspezifisches Transportsystem dar, d.h. es dient auch dem Transport anderer Zucker (Galaktose). SGLT2 transportiert ausschließlich Glukose, allerdings mit einer geringeren Affinität, und es bewältigt im proximalen Tubulus mit relativ geringem Energieaufwand die Reabsorption des größten Teils der filtrierten Glukose. Bei einer Glukosurie wird die Reabsorptionsleistung der Niere überschritten. Bei einer Abnahme der Transportrate von Glukose aus dem Tubuluslumen (renale Glukosurie) unterscheidet man eine direkte von einer indirekten Beeinträchtigung der Glukosecarrier. Bei letzterem führt eine verringerte Na^+/K^+ -ATPase-Aktivität zu einer

Abschwächung des Natriumgradienten (Lang und Fromm 2000). Verschiedene Autoren stellten fest, dass ein an Versuchstieren ausgelöstes FS die Na^+/K^+ -ATPase-Aktivität verringerte, und daraufhin der Transport von Glukose aus dem Lumen beeinträchtigt war (Castano et al 1997, Badary 1999a, Badary 1999b, Sener et al. 2004). Dies führte zur exzessiven Ausscheidung von Glukose im Harn.

1.6. Biotransformation

Prodrugs wie IFO werden durch Biotransformation erst in eine wirksame Form umgewandelt. Der IFO-Metabolismus unterliegt einer Autoinduktion, wodurch eine Beschleunigung des Stoffumsatzes durch wiederholte Gabe von IFO selbst ausgelöst wird (Fischer et al. 2006). Dabei sind die genauen Mechanismen noch weitgehend unklar. Vermutet wird, dass IFO die Synthese der Proteine reduziert, welche im Sinne eines negativen Feedback die Aktivität verschiedener CYP-Isoformen inhibieren (Kerbusch et al. 2001).

Am Metabolismus von IFO sind insbesondere die Isoenzyme CYP 3A4, 3A5 und 2B6 beteiligt. Sie generieren die Entstehung unterschiedlicher Stoffwechselprodukte, welche sich in ihrer Toxizität unterscheiden (Aleksa et al. 2005). Durch CYP 3A4/5 wird überwiegend eine Hydroxylierung eingeleitet und es entsteht das erwünschte 4-Hydroxy-IFO (4-OH-IFO). Hingegen steigt die Menge von CAA insbesondere durch die CYP 2B6-vermittelte Seitenkettenoxidierung (Roy et al. 1999b). Im menschlichen Organismus besteht für verschiedene CYP-Isoformen eine Organselektivität. CYP 3A4 wird in der Leber in größeren Mengen, hingegen in der Niere kaum exprimiert. Umgekehrt ist in der Niere CYP 3A5 in größeren Mengen als in der Leber präsent. Allerdings weisen beide Isoformen Überschneidungen bezüglich ihrer Substratspezifität auf (McCune et al. 2005). CYP 2B6 wird gleichermaßen in Leber und Niere exprimiert.

Shi et al. (2001) untersuchten die Auswirkungen von IFO auf die Leber von Ratten. Dazu applizierten sie in zwei verschiedenen Versuchsanordnungen IFO (einmal täglich 4mg/100g KG für 5 Tage bzw. einmalig 200mg/100g Kg i.p.). Beobachtet wurde ein verringerter Monooxygenase-Gehalt. Tierversuche zur Detektion bestimmter CYP-Isoformen sind nur bedingt auf den Menschen übertragbar, da IFO bei Mensch und Ratte durch verschiedene Isoenzyme metabolisiert wird. Aufgrund dessen werden menschliche CYP-Isoformen mit ähnlicher Metabolismusrate auf

Tiermodelle übertragen. Dabei ist CYP 2B6 des Menschen ein Ortholog von CYP 2B1 und 2B2 der Ratte. Zudem wird die Aktivität der Rattenenzyme CYP 3A1 und 3A2 in Orthologie des menschlichen CYP 3A4 verwendet.

1.7. Morphologie

Funktionelle Einheiten der **Leber** sind die Leberläppchen. Sie bestehen aus den in Zellbalken angeordneten Hepatozyten, die konzentrisch angeordnet sind und durch eine apikale (kanalikuläre) und basolaterale (sinusoidale) Membran polarisiert aufgebaut sind. Die durch Periportalfelder begrenzten Lobuli bestehen aus einem Ast der Arteria hepatica, der Vena porta und des Ductus biliferi. Sinusoide transportieren Pfortader- sowie Leberarterienblut und verlaufen als aufgeweitete Kapillaren zur V. centralis. In den Hepatozyten zeugt der hohe Gehalt an Mitochondrien von energieaufwendigen Prozessen wie Biotransformation, Speicherung und Biosynthese. Unter anderem fällt der Leber durch die Speicherung von Glukose in Form von Glykogen eine wichtige Funktion in der Energiebereitstellung zu. Lichtmikroskopisch können Glykogenfelder besonders nach PAS-Färbung nachgewiesen werden und zusammen mit dem Vorkommen von Lipidtröpfchen Aufschluss über den Ernährungszustand des Organismus geben.

In Experimenten mit Ratten beobachteten Shi et al. (2001) zehn Tage nach IFO-Gabe (einmal täglich 4mg/100g KG für 5 Tage bzw. einmalig 200mg/100g KG i.p.) im perivenösen Gebiet der Leberläppchen Vakuolisierung und vereinzelt herdförmige Nekrosen von Leberzellverbänden umgeben von neutrophilen Granulozyten. Elektronenmikroskopisch waren die Mitochondrien und das endo-plasmatisches Retikulum vergrößert.

Die kleinste funktionelle Einheit der **Niere** ist das Nephron. Es wird in Glomerulum und Tubulus untergliedert. Die Glomerula befinden sich in der Nierenrinde, welche das Nierenmark mit dem Tubulussystem umspannt. Hier wird plasmaisotoner Primärharn aus dem Blut gefiltert. Die Epithelzellen in den einzelnen Tubulusabschnitten unterscheiden sich funktionell voneinander. Außerdem trägt das Schlussleistungssystem als Verbindung der Epithelzellen untereinander und seine Durchlässigkeit von Wasser und den darin gelösten Stoffen dazu bei, das Ultrafiltrat zu konzentrieren, wobei Endharn entsteht.

Viele Substanzen im Ultrafiltrat werden im Tubulus resorbiert, indem sie entweder einem elektrochemischen Gradienten folgen, den hohen Natriumgradienten für den Kotransport nutzen oder im Strom des resorbierten Wassers durch „solvent drag“ mitgerissen werden. Aminosäuren, Glukose sowie organische Säuren werden durch aktive Transportsysteme im proximalen Tubulus fast vollständig in das Blut zurückgenommen. Daher liegt die Vermutung nahe, histopathologische Veränderungen nach IFO-Gabe in diesem Nephronabschnitt zu finden. Tatsächlich wird von einigen Autoren (Germann et al. 2005) eine tubuläre Nekrose nach IFO-Applikation beschrieben. Auch ein erhöhter Kollagengehalt und neutrophile Granulozyten im Nierengewebe (Sener et al. 2004) weisen auf pathologische Veränderungen im Nierenparenchym nach IFO-Gabe hin. Andere Autoren dagegen beobachteten keine nekrotischen Veränderungen im Bereich der proximalen Tubuli nach IFO-Applikation (Nissim und Weinberg 1996).

1.8. Hungerdystrophie nach IFO-Therapie

Wie jede zytostatische Behandlung ist die Medikation von IFO für die betroffenen Patienten mit einer interindividuell unterschiedlich großen Belastung verbunden. Allgemeine Nebenwirkungen wie z.B. Malnutrition, ein reduziertes Allgemeinbefinden sowie psychische Alteration können den Therapieverlauf beeinflussen. Somit besteht auch bei Versuchstieren die Möglichkeit, dass unspezifische Nebenwirkungen ausgelöst durch IFO, die Interpretation der Versuche erschweren und die Ausbildung eines FS maskieren. Daher werden in diesem Kapitel Folgen des Hungerns, die im Zusammenhang mit der IFO-Behandlung stehen, näher charakterisiert.

1.8.1. Gewichtsentwicklung

Eine Tumorkachexie ist resistent gegenüber Nahrungszufuhr bzw. Medikamenten (Tisdale 2004). Argiles et al. (2006) räumen ein, dass sowohl die Tumorerkrankungen als auch die dagegen eingeleiteten Behandlungen beim Menschen zu Gewichtsabnahme und Kachexie führen können. Anorexie ist dabei die Folge der verminderten Nahrungsaufnahme, welche häufig die Lebensqualität des Tumorpatienten verringert. Allgemeine Nebenwirkungen wie Übelkeit, Erbrechen, schlechtes Allgemeinbefinden und Müdigkeit aber auch Schleimhautentzündungen

können die Nahrungsaufnahme erschweren bzw. verhindern (Khayat 2000). Auch psychologische Effekte wie Depressionen können Appetitlosigkeit bedingen und die Lebensqualität beeinträchtigen, sodass daraus eine Mangelernährung entstehen kann, und konsekutiv das Gewicht reduziert wird.

1.8.2. Harnvolumen und Ausscheidung von Elektrolyten

Wie in Kapitel 1.3. erwähnt, ist eine IFO-induzierte Nierenfunktionsstörung durch Polyurie, Aminoazidurie, Glukosurie sowie eine erhöhte renale Ausscheidung von Natrium, Kalium und Phosphat charakterisiert (Sener et al. 2004). Ein ähnliches Bild findet man zunächst zu Beginn einer Fastenperiode. Hungernde Tiere scheiden trotz verringerter Wasseraufnahme größere Mengen Harn aus. Allerdings wird nach drei Tage andauernder Nahrungskarenz eine deutliche Verringerung des Harnvolumens beobachtet (Thompson et al. 1987). Es wurde festgestellt, dass Aquaporin 2 im Sammelrohr verringert ist. Dieses Glykoprotein wird, durch ADH stimuliert, in der luminalen Membran des distalen Tubulus und des Sammelrohres exprimiert und ist an der Wasserresorption beteiligt (Lang und Fromm 2000). Eine darauffolgende oligurische Phase korreliert mit einem Anstieg der Aquaporin 2-Expression, welche allerdings mit einem unveränderten Gehalt an ADH im Plasma während der gesamten Fastenperiode einhergeht. Dies bedeutet, dass Wasserresorption auf einen ADH-unabhängigen Mechanismus zurückzuführen ist (Wilke et al. 2005).

Infolge von Mangelernährung werden energiereiche Substanzen sowie Elektrolyte vom Körper zurückgehalten. Da die Aufrechterhaltung der Homöostase sowie die Kontrolle des Volumens und der Elektrolyt-Zusammensetzung der Extrazellularräume eine Funktion der Niere darstellt (Lang und Fromm 2000), wird bei Mangelernährung eine Rücknahme dieser Solute aus dem Ultrafiltrat registriert. Steele (1982) beobachtete einen Rückgang der Phosphatausscheidung im Harn von sieben Tage fastenden Ratten. Zusätzlich kommt es zu einer Abnahme des renalen Plasmaflusses sowie der GFR (Boim et al. 1992).

1.8.3. Stoffwechsel

Ein verändertes Ernährungsverhalten sowie eine Anpassung des Metabolismus an eine Mangelernährung wird durch Aktivität und Gehalt der Isoformen CYP 1A, 2B,

Einleitung

2E1 und 3A in Niere und Leber wiedergespiegelt. In der Leber von hungernden Ratten wird ein Anstieg der Aktivität von CYP 2E1 beobachtet. Die Aktivität von CYP 1A, 2B und 3A ist verringert (Ronis et al. 1998, Kachula und Pentiuk 2004). Die Niere hingegen zeigt eine erhöhte Aktivität aller CYP-Isoformen (Ronis et al. 1998). Bei anhaltendem Fasten wird auf gespeicherte Energie zurückgegriffen. Zunächst wird Glykogen aus der Leber verstoffwechselt. Außerdem werden Fette aus dem Lebergewebe mobilisiert. Die Glukosehomöostase kann durch die in Leber und Niere stattfindende Glukoneogenese mit beeinflusst werden. Als Indikator dient hierbei das Enzym Glukose-6-Phosphatase, welches an der Membran des endoplasmatischen Retikulums lokalisiert ist und die Bildung von Glukose vermittelt. Bei Malnutrition kommt es zu einem Anstieg sowohl der mRNA-Expression für Glukose-6-Phosphatase als auch deren Aktivität (Van Schaftingen und Gerin 2002). Bei der Ratte lässt allerdings laut Minassian und Mithieux (1994) der Anstieg der Phosphataseaktivität in der Leber zwei Tage nach Beginn des Fastens nach. Ein Anstieg der Aktivität in der Niere hingegen konnte bis zum Ende des Fastens (4.Tag) beobachtet werden.

2. Ziel der Arbeit

Eine Tumorthherapie mit Ifosfamid (IFO) ist aufgrund der oftmals schweren Nebenwirkungen limitiert. 20-30% der IFO-behandelten Patienten erkranken an einer akuten Nephropathie, welche sich bei bis zu 5% zum Fanconi-Syndrom entwickeln kann.

Über den Mechanismus der Entstehung eines FS, das mit einer deutlichen Verzögerung der Entwicklung und Einschränkung der Lebensqualität des meist jugendlichen Patienten einhergeht, besteht noch Unklarheit. Ziel dieser Untersuchung ist es, mit vertretbarem Aufwand ein reproduzierbares Tiermodell eines FS zu entwickeln. Dies soll es ermöglichen, in Zukunft detaillierter nach Ursachen und prädisponierenden Faktoren, die zur Entstehung eines FS beitragen, zu forschen. Da IFO zur Behandlung von Tumoren im Kindesalter eingesetzt wird, wurden die drei folgenden Versuchsansätze in die Untersuchung einbezogen:

- 55 Tage alten weiblichen Ratten wurde alle drei Wochen in vier Behandlungszyklen drei mal 8mg IFO/100g KG i.p. injiziert. Diureseversuche fanden zwei Tage nach jedem Behandlungszyklus statt.
- 20 Tage alten weiblichen Versuchstieren wurde in fünf Behandlungszyklen mit einem Abstand von zwei Wochen drei mal 8mg IFO/100g KG i.p. appliziert. Diureseversuche fanden 1, 2, 3, 4 und 5 Monate nach dem letzten Zyklus statt.
- 30 Tage alten männlichen Versuchstieren wurde in vier Zyklen mit zweiwöchigem Abstand 6mg IFO/100g KG i.p. injiziert. Sieben Wochen nach der letzten Applikation wurde ein Diureseversuch durchgeführt sowie nach Tötung der überlebenden Tiere Organe (Nieren und Lebern) entnommen. Diese wurden gewogen und auf Gehalt und Aktivität der Monooxygenasen sowie morphologische Veränderungen untersucht.

Die Kontrolle der Körpergewichtsentwicklung, der Harnparameter (Harnvolumen, Kreatininclearance, Protein- und Glukoseausscheidung, Elektrolytzusammensetzung) und der morphologischen Veränderungen dienten dazu, FS-artige Symptome zu erkennen. Die Untersuchung der Biotransformation nach Gabe von IFO sollte weitere mögliche Effekte der IFO-Behandlung aufzeigen, die ein FS begünstigen könnten.

3. Material und Methoden

3.1. Versuchstiere

Die Untersuchungen wurden an Wistar-Ratten (Han:Wist) aus dem Auszuchtstamm des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie am Klinikum der FSU Jena durchgeführt. Die Haltung der Tiere erfolgte in Plastikkäfigen (35cm x 55cm x 18cm) unter standardisierten Bedingungen, d.h. bei einer Raumtemperatur von 20-25°C, bei einer relativen Luftfeuchte von 50% und einem 12h/12h Hell-/Dunkelrhythmus. Bis zum 30. Lebenstag verblieben je sechs Jungtiere bei der Mutter und wurden von ihr gesäugt. Danach erhielten je vier Tiere pro Käfig Standardfutter (Altromin 1326, Altromin GmbH Laage, Deutschland) und Wasser ad libitum. Als Einstreu wurde Granulat (Altromin GmbH Laage, Deutschland) verwendet. Die Genehmigung der Tierschutzkommission des Freistaates Thüringen zur Durchführung der Versuche lag vor (Reg.-Nr. 02-57/03; 02-71/03; 02-56/04).

3.2. Versuchsanordnung

Es wurden drei Versuchsreihen durchgeführt, in denen die Effekte unterschiedlicher Dosierungsschemata von Ifosfamid (IFO; IFO-cell[®]N2000 Lösung, cell pharm GmbH, Hannover, Deutschland) an männlichen und weiblichen Ratten verschiedenen Alters untersucht worden sind. Die Konzentration der intraperitoneal (i.p.) injizierten Ifosfamidlösung wurde mit 0,9%er NaCl-Lösung so zubereitet, dass die entsprechende Dosis in 5 ml / 100 g Körpergewicht (KG) enthalten war. Zum Vergleich dienten Kontrolltiere, denen äquivalente Volumina 0,9%er NaCl-Lösung injiziert wurden. Die Applikation erfolgte in Zyklen von einer Injektion täglich an drei aufeinanderfolgenden Tagen.

Versuchsreihe 1: Dieser Versuch wurde an 60 Tage alten weiblichen Ratten durchgeführt (n=40), die jeweils eine Dosis von 8 mg IFO / 100g KG erhielten. Vier Therapiezyklen fanden im Abstand von drei Wochen statt. Diureseversuche wurden wöchentlich, in den Behandlungswochen jeweils zwei Tage nach der letzten IFO-Gabe, durchgeführt.

Versuchsreihe 2: Anschließend wurden die Auswirkungen von IFO auf die Nierenfunktion von 20 Tage alten weiblichen Ratten (n=40) untersucht. Die Tiere

erhielten 8 mg IFO / 100g KG in fünf Zyklen im Abstand von je zwei Wochen. Diureseversuche fanden nach dem fünften Zyklus einmal monatlich über einen Zeitraum von 5 Monaten statt.

Versuchsreihe 3: Im letzten Versuch wurden 30 Tage alte männliche Ratten (n=40) mit einer Dosis von 6 mg IFO / 100g KG behandelt. Die Tiere erhielten IFO in vier aufeinanderfolgenden Zyklen im Abstand von zwei Wochen. Ein Diureseversuch fand sieben Wochen nach dem letzten IFO-Zyklus statt. Darauf wurde den in Ethernarkose getöteten Tieren Leber und Nieren entnommen, gewogen und für Modellreaktionen zur Charakterisierung verschiedener Cytochrom P450-Isoenzyme (s. Kapitel 3.4.4.) bei -80°C aufbewahrt sowie für morphologische Untersuchungen (s. Kapitel 3.4.5.) aufgearbeitet.

3.3. Versuchsdurchführung

Diureseversuche

In allen Versuchsserien wurden Diureseversuche an wachen Ratten durchgeführt. Dabei wurde zunächst das Körpergewicht bestimmt. Danach erfolgte die Entleerung der Harnblase der Tiere durch Nackengriff und leichten suprapubischen Druck. Im Anschluss daran wurde den Tieren 2,5 ml 0,9%ige Kochsalzlösung / 100g KG i.p. injiziert. Es schloss sich eine einstündige Harnsammelperiode an. Dazu wurden die Ratten einzeln in Stoffwechselkäfige gesetzt und der Harn getrennt vom Kot in Reagenzgläsern gesammelt. Nach Ablauf einer Stunde wurde die Harnblase erneut entleert und die Tiere in die Käfige zurückgesetzt. Der gesammelte Harn wurde bis zur weiteren Aufarbeitung (s. Kapitel 3.4.3.) bei -20°C aufbewahrt. Nach dem letzten Diureseversuch wurden die Versuchstiere in Ethernarkose getötet und das Blut für die Analytik im Serum gesammelt (s. Kapitel 3.4.3.).

3.4. Bestimmungsmethoden

3.4.1. Bestimmung des Körpergewichtes

Das Körpergewicht der Ratten wurde mit einer Waage (Accurat 2000, Werner Dorsch, Rödermark, Deutschland) ermittelt.

3.4.2. Bestimmung des Harnvolumens

Das in einer Stunde ausgeschiedene Harnvolumen wurde mit einer 1ml Präzisionsglasspritze (Original Rekord Metall-Glas-Spritze, Injekta, Steinach, Deutschland) bestimmt, auf das Körpergewicht bezogen und bis zur weiteren Aufarbeitung bei -20°C aufbewahrt.

3.4.3. Konzentrationsbestimmungen in Harn und Serum

Die in die Auswertung einbezogenen Parameter wurden mit dem klinisch-chemischen Analyseautomaten SYNCHRON LX[®] 20 (Beckmann-Coulter, Krefeld, Deutschland) bestimmt (Institut für Klinische Chemie, FSU Jena).

3.4.3.1. Kreatinin

Die Kreatininkonzentration wurde im SYNCHRON LX[®] 20 mittels einer kinetischen Jaffé-Methode bestimmt (Jaffé 1886, Vasiliades 1976, Heinegard und Tiderstrom 1973).

Urin wurde in ein Reaktionsgefäß mit alkalischer Pikratlösung titriert, wobei ein roter Farbkomplex entstand (Narayanan und Appleton 1980, Spencer 1986). Bei 520 nm wurde die Extinktion 19 bis 25 Sekunden nach der Probeninjektion abgelesen. Die Geschwindigkeit der Extinktionsänderung war direkt proportional zur Kreatininkonzentration.

Die Kreatininclearance als Maß für die glomeruläre Filtrationsrate errechnet sich als Produkt aus der Kreatininkonzentration im Urin und dem Harnvolumen pro 100 g Körpergewicht und Minute, dividiert durch die Kreatininkonzentration im Serum:

$$Cl_{Krea} = \frac{C_{Krea(U)} \times V_{(U)}}{C_{Krea(S)}} \left[\frac{ml}{100gKG \times min} \right]$$

Cl_{Krea} = Kreatininclearance

$C_{Krea(U)}$ = Kreatininkonzentration im Urin [mol/l]

$C_{Krea(S)}$ = Kreatininkonzentration im Serum [mol/l]

$V_{(U)}$ = Harnvolumen [ml/(100g KG x min)]

3.4.3.2. Gesamteiweiß

Die Gesamtproteinkonzentration wurde mit einer kinetischen Biuret-Methode bestimmt (Gornall et al. 1949). Die Proteine in der Probe verbanden sich mit dem Reagenz und bildeten alkalisches Kupfer-Protein-Chelat. Die daraus resultierende Veränderung der Absorption wurde vom Detektor bei einer Wellenlänge von 545 nm registriert. Die beobachtete Geschwindigkeit der Chelatbildung war zu der Gesamtproteinkonzentration in der Probe direkt proportional.

3.4.3.3. Albumin

Die Albuminkonzentration wurde mittels einer digitalen bichromatischen Endpunktmethode unter Verwendung eines Bromkresolpurpur-Reagenzes bestimmt (Pinnell und Northam 1978). In ein Reaktionsgefäß mit Bromkresolpurpur wurde 5 µl Probe injiziert (ein Teil Probe auf 114 Teile Reagenz). Dabei bildete das Albumin aus der Probe mit dem Reagenz einen Bromkresolpurpur-Albuminkomplex.

SYNCHRON LX[®] 20 registrierte die Absorptionsänderung bei einer Wellenlänge von 600 nm, welche direkt proportional zur Albuminkonzentration war.

3.4.3.4. Natrium

Die Bestimmung der Natriumkonzentration erfolgte durch indirekte Potentiometrie mittels zweier gläserner Natriumelektroden; eine davon diente als Referenzelektrode. Ein Probenvolumen von 62 µl wurde mit einer gepufferten Lösung gemischt (ein Teil Probe auf 21 Teile Tris(hydroxymethyl)methylamin-Puffer (Tris-Puffer)). Um einen konstanten Aktivitätskoeffizienten für Natriumionen zu erzielen und die Elektrode auf

die Konzentrationswerte zu kalibrieren, wurde der Puffer mit einer molaren Stärke von 230 mmol/l verwendet.

3.4.3.5. Kalium

Die Konzentration an Kalium wurde indirekt potentiometrisch durch eine kaliumsensitive Elektrode und eine Natriumreferenzelektrode bestimmt. Ein Teil Probenvolumen (62 μ l) wurde in 21 Teile Tris-Pufferlösung gegeben. Auch hier wurde dieser Puffer mit einer molaren Stärke von 230 mmol/l eingesetzt. Mit dieser Konzentration wurde die Elektrode auf die Konzentration der Probenlösung kalibriert um einen konstanten Aktivitätskoeffizienten zu erhalten.

3.4.3.6. Phosphat

Die Phosphatkonzentration wurde durch eine kinetische Methode bestimmt (Fiske und Subbarow 1925, Dryer und Routh 1963). Anorganisches Phosphat, welches sich in einem Probenvolumen von 8 μ l befand, wurde in ein Reaktionsgefäß mit H₂SO₄-Lösung und Ammoniummolybdat injiziert (ein Teil Probe auf 72 Teile Reagenz). Dabei entstand ein farbiger Phosphormolybdatkomplex. Das System registrierte die Veränderung der Absorptionsgeschwindigkeit von gelbem Phosphormolybdat bei einer Wellenlänge von 365 nm. Die Messung der Geschwindigkeit 19 bis 25 Sekunden nach Einbringen der Probe erwies sich als direkt proportional zur Konzentration des anorganischen Phosphats in der Probe und wurde von SYNCHRON LX[®] 20 zur Berechnung und Angabe der Phosphorkonzentration verwendet.

3.4.3.7. Glukose

Die Glukosekonzentration wurde durch eine kinetische Sauerstoffmethode mittels einer Sauerstoffelektrode bestimmt (Kadish und Hall 1965, Kadish et al. 1968). 10 μ l Probenvolumen wurden in ein Reaktionsgefäß mit Glukoseoxidase injiziert (ein Teil Probe auf 76 Teile Reagenz). SYNCHRON LX[®] 20 bestimmte die Sauerstoffmenge, die von der Glukoseoxidase verbraucht wurde. Diese Menge war der Glukosekonzentration direkt proportional.

3.4.4. Modellreaktionen zur Charakterisierung verschiedener Cytochrom P450-Isoenzyme

3.4.4.1. 7-Ethoxyresorufin-O-Deethylierung (EROD)

Die EROD ist eine Modellreaktion für CYP 1A-Isoformen des Cytochrom P450-Systems, speziell für CYP 1A1. Bei dieser Reaktion wird 7-Ethoxyresorufin zu Resorufin deethyliert (Pohl und Fouts 1980). Dieses kann fluorimetrisch nachgewiesen werden.

0,1 ml 7-Ethoxyresorufin-Lösung (0,1 mmol/l) wurde in Reagenzröhrchen pipettiert. Anschließend wurden zugegeben:

- 0,1 ml Natrium-Phosphat-Puffer (0,1 mol/l; pH 7,4),
- 0,1 ml Magnesiumchlorid-Lösung (0,1 mol/l),
- 0,1 ml Glukose-6-Phosphat-Lösung (0,025 mol/l)
- 0,1 ml 9000 g-Überstand.

Der 9000g-Überstand aus Lebergewebe wurde 1:10 mit 0,1 mol/l Natrium-Phosphat-Puffer, pH 7,4, verdünnt; Überstand aus Nierengewebe wurde unverdünnt verwendet.

Durch Zugabe von 0,1 ml NADPH-Lösung (2,5 mmol/l) erfolgte der Reaktionsstart.

Nach 5 min (Leber) bzw. 15 min (Niere) Inkubation unter Schütteln bei 37°C wurde die Reaktion durch Zugabe von 1 ml Methanol gestoppt.

Es wurde ein Leerwert bestimmt, bei dem die Reaktion bereits vor Zugabe des 9000g-Überstandes mit 1 ml Methanol gestoppt wurde.

Anschließend wurden die Proben 10 min lang bei 5500 g zentrifugiert (Megafuge 1.0, Heraeus Instruments; Hanau, Deutschland).

Die Fluoreszenz wurde am Fluoreszenzspektrophotometer (F2000, Hitachi; Kyoto, Japan) bei einer Exzitationswellenlänge von 540 nm und einer Emissionswellenlänge von 585 nm gemessen. Die Reagenzien für diese sowie die im Folgenden beschriebenen Modellreaktionen wurden von der Firma Sigma (Sigma-Aldrich Chemie, München, Deutschland) bezogen.

Die Berechnung der Enzymaktivitäten (A) erfolgte nach der folgenden Formel:

$$A = \frac{\Delta F \times EF \times VF}{Prot \times t} \left[\frac{\text{pmol}}{\text{mg Protein} \times \text{min}} \right]$$

ΔF = Differenz der Fluoreszenz zwischen Haupt- und Leerwert

EF = Faktor der Eichkurve [pmol/l]

VF = Verdünnungsfaktor

$Prot$ = Proteinkonzentration des 9000 g-Überstandes [mg/ml]

t = Inkubationszeit [min]

3.4.4.2. 7-Pentoxoresorufin-O-Demethylierung (PROD)

Mit der PROD kann vorwiegend die CYP-Familie 2B nachgewiesen werden. Prinzipiell wird die Bestimmung der PROD analog zu der der EROD durchgeführt. Es wird lediglich statt 7-Ethoxoresorufin als Substrat 7-Pentoxoresorufin in einer Konzentration von 0,5 mmol/l verwendet. Die Inkubationszeit beträgt für die Leber 10 min und für die Niere 20 min (Lubet et al. 1985).

3.4.4.3. 7-Ethoxycoumarin-O-Deethylierung (ECOD)

Mit der ECOD können vorwiegend die CYP-Subtypen 1A, 2A, 2B und 2C nachgewiesen werden. Die Reaktion beruht auf einer Hydroxylierung an der Ethylgruppe von 7-Ethoxycoumarin. Der Nachweis erfolgt über das Reaktionsprodukt 7-Hydroxycoumarin, welches durch eine anschließende nichtenzymatische Abspaltung entsteht und im alkalischen Milieu fluoresziert (Aitio 1978).

In die Reaktionsgefäße wurden 0,1 ml 7-Ethoxycoumarin-Lösung (0,4 mmol/l) pipettiert. Dann wurden hinzugefügt:

0,1 ml Natrium-Phosphat-Puffer (0,05 mol/l; pH 7,4),

0,1 ml Glukose-6-Phosphat-Lösung (0,025 mol/l)

0,1 ml Magnesiumchlorid-Lösung (0,1 mol/l),

0,1 ml 9000 g-Überstand.

Der 9000g-Überstand aus Lebergewebe wurde 1:10 mit 0,1 mol/l Natrium-Phosphat-Puffer, pH 7,4 verdünnt; Überstand aus Nierengewebe wurde unverdünnt verwendet.

Der Reaktionsstart erfolgte durch Zugabe von 0,1 ml NADPH-Lösung (2,5 mmol/l). Für die Dauer von 10 min (Leber) bzw. 20 min (Niere) wurden die Proben bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Daraufhin erfolgte der Reaktionsstopp durch 0,5 ml Trichloressigsäure (TCA) mit einer Stoffmengenkonzentration von 0,3 mol/l

Es wurde ein Leerwert mitgeführt, bei dem vor Zugabe des 9000 g-Überstandes die Reaktion durch 0,5 ml TCA gestoppt wurde.

Die Fluoreszenzmessung erfolgte im alkalischen Milieu durch Zugabe von 4 ml NaOH (0,05 mol/l) mit dem Fluoreszenzspektralphotometer bei einer Exzitationswellenlänge von 375 nm und einer Emissionswellenlänge von 454 nm. Die Berechnung der Enzymaktivitäten (A) wurde mit Hilfe der folgenden Formel durchgeführt:

$$A = \frac{\Delta F \times EF \times VF}{\text{Prot} \times t} \left[\frac{\text{pmol}}{\text{mg Protein} \times \text{min}} \right]$$

ΔF = Differenz der Fluoreszenz zwischen Haupt- und Leerwert

EF = Faktor der Eichkurve [pmol/l]

VF = Verdünnungsfaktor

Prot = Proteinkonzentration des 9000 g-Überstandes [mg/ml]

t = Inkubationszeit [min]

3.4.4.4. *p*-Nitrophenol-Hydroxylierung (PNPH)

Die PNPH ist eine Modellreaktion, die spezifisch CYP 2E1 nachweist. CYP 2E1 katalysiert die Hydroxylierung von *p*-Nitrophenol zu *p*-Nitrocatechol, welches direkt bei 535 nm spektrophotometrisch gemessen werden kann (Methode modifiziert nach Chang et al. 2006).

10 μ l *p*-Nitrophenol (5 mmol/l) wurde in ein Reaktionsgefäß pipettiert. Darauf wurden folgende Lösungen hinzugefügt:

335 μ l Natrium-Phosphat-Puffer (0,05 mol/l; pH 7,4),

25 μ l Glucose-6-Phosphat (0,066 mol/l),

25 μ l Magnesiumchlorid (0,066 mol/l),

80 μ l 9000 g-Überstand.

Mit der Zugabe von 25 μ l NADPH (0,026 mol/l) wurde die Reaktion gestartet.

Die Inkubation der Proben erfolgte unter Schütteln im 37°C warmen Wasserbad.

Nach 60 min Inkubationszeit für den Leber- und Nierenüberstand wurde die Reaktion

durch Hinzufügen von 0,1 ml TCA (0,31 mol/l) gestoppt und anschließend 10 min lang bei 5500 g zentrifugiert (Megafuge 1.0, Heraeus Instruments; Hanau, Deutschland). Für jede Probe wurde eine Doppelbestimmung sowie ein Leerwert angesetzt, wobei der Leerwert statt des p-Nitrophenols 0,1 ml Natrium-Phosphat-Puffer (0,1 mol/l, pH 7,4) enthielt und vor Zugabe des Überstandes mit 0,1 ml TCA (0,3 mol/l) gestoppt wurde. Vom klaren Überstand wurden 0,5 ml abpipettiert und mit 0,25 ml Natriumhydroxid (2 mol/l) versetzt, wobei sofort eine rötliche Farbe entstand. Die photometrische Messung der Proben erfolgte bei 535 nm und 1 cm Schichtdicke am Spekol 11 (Carl Zeiss; Jena, Deutschland).

Für die Eichkurve wurden 0; 2,5; 5; 10; 20; 40 nmol p-Nitrocatechol pro Liter verwendet. Je 10 µl wurden dem Probenansatz anstelle des Substrats hinzugefügt. Statt des 9000 g-Überstandes wurden 80 µl des Natrium-Phosphat-Puffers verwendet.

$$A = \frac{\Delta E \times EF}{\text{Prot} \times t} \left[\frac{\text{nmol}}{\text{mg Protein} \times \text{min}} \right]$$

A = Enzymaktivität

ΔE = Extinktionsdifferenz zwischen Haupt- und Leerwerten

EF = Faktor der Eichkurve [nmol/l]

t = Inkubationszeit [min]

Prot = Proteinkonzentration des 9000 g-Überstandes [mg/ml]

3.4.4.5. Ethylmorphin-N-Demethylierung (EMND)

Die EMND beruht auf der Hydroxylierung an der N-Methylgruppe von Ethylmorphin durch CYP 3A, sowie der anschließenden nichtenzymatischen Abspaltung von Formaldehyd. Dies wiederum reagiert mit Acetylaceton und Ammoniumionen zu 3,5-Diacetyl-1,4-Dihydrolutidin, einer Verbindung von gelber Farbe, die photometrisch bei einer Wellenlänge von 412 nm nachgewiesen werden kann (Klinger und Müller 1977).

Es wurden 0,5 ml Natrium-Phosphat-Puffer (0,5 mol/l; pH 7,4) mit den folgenden Lösungen gemischt:

0,05 ml NADPH-Lösung (6 mmol/l),

0,05 ml Glukose-6-Phosphat-Lösung (0,1 mol/l),

0,05 ml Magnesiumchlorid-Lösung (0,1 mol/l),

Material und Methode

0,05 ml Semicarbazid-Lösung (0,2 mol/l) sowie
0,2 ml 9000 g-Überstand.

Der 9000g-Überstand aus Lebergewebe wurde 1:4 mit 0,1 mol/l Natrium-Phosphat-Puffer, pH 7,4 verdünnt; Überstand aus Nierengewebe wurde unverdünnt verwendet. Die Enzymreaktion wurde durch Zugabe von 0,1 ml Ethylmorphinlösung (6 mmol/l) gestartet. Nach einer Inkubationszeit von 10 min unter Schütteln im 37°C warmen Wasserbad wurde die Reaktion durch Hinzufügen von 0,1 ml TCA (0,31 mol/l) gestoppt. Anschließend wurden die Proben 10 min lang bei 5500 g zentrifugiert.

0,5 ml des klaren Überstandes wurden mit 0,5 ml Nash-Reagenz versetzt und 40 min lang bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Das Nash-Reagenz setzt sich zusammen aus 30 g Ammoniumacetat, 0,4 ml Acetylaceton und 0,6 ml Eisessig in 100 ml a.d..

Für jede Probe wurde eine Doppelbestimmung sowie ein Leerwert angesetzt, wobei der Leerwert statt des Ethylmorphins 0,1 ml Natrium-Phosphat-Puffer (0,1 mol/l) enthielt und vor Zugabe des 9000 g-Überstandes mit 0,1 ml TCA (0,31 mol/l) versetzt wurde.

Für die Eichkurve wurden 2; 1; 0,5; 0,25; 0 µmol Formaldehyd pro Liter verwendet. Die Eichwerte enthielten neben 0,1 ml der Formaldehydverdünnungen die gleichen Cofaktoren wie die Hauptwerte, wurden aber genau wie die Leerwerte vor der Zugabe des 9000 g-Überstandes mit 0,1 ml TCA versetzt und nicht mit inkubiert.

Die Messung erfolgte am Spekol 11 gegen a.d. bei einer Wellenlänge von 412 nm und einer Schichtdicke von 0,5 cm.

$$A = \frac{\Delta E \times EF}{\text{Prot} \times t} \left[\frac{\text{nmol}}{\text{mg Protein} \times \text{min}} \right]$$

A = Enzymaktivität

ΔE = Extinktionsdifferenz zwischen Haupt- und Leerwerten

EF = Eichfaktor [nmol /l]

Prot = Proteinkonzentration des 9000 g-Überstandes [mg/ml]

t = Inkubationszeit [min]

3.4.4.6. Testosteron-Hydroxylase (2β-TH)

Die Bestimmung der verschiedenen Testosteron-Hydroxylase-Aktivitäten, die von unterschiedlichen Cytochrom P450-Isoenzymen geleistet werden, erfolgte mit Hilfe

der Hochdruckflüssigchromatographie (HPLC-Gerät der Fa. Jasco, Groß-Umstadt; Deutschland).

100 μ l des 9000 g-Überstandes, gewonnen aus Lebergewebe (1:5 verdünnt mit 0,1 mol/l Natrium-Phosphat-Puffer, pH 7,4) und Nierengewebeüberstand (unverdünnt) wurden in den Reaktionsgefäßen mit den folgenden Lösungen gemischt:

- 200 μ l Magnesiumchlorid (0,1 mol/l),
- 200 μ l Glukose-6-Phosphat (0,025 mol/l);,
- 300 μ l Natrium-Phosphat-Puffer (0,1 mol/l; pH 7,4) sowie
- 10 μ l Testosteron (0,05 mol/l).

Der Start der Enzymreaktion erfolgte durch Zugabe von 200 μ l NADPH (2,5 mol/l). Anschließend wurden die Proben unter Schütteln im 37°C warmen Wasserbad für die Dauer von 10 min (Leber) bzw. 30 min (Niere) inkubiert. Der Reaktion wurde durch Zugabe von 1,5 ml TCA (0,3 mol/l) gestoppt. Daraufhin wurden die Proben 10 min lang bei 5500 g zentrifugiert.

Nun wurden auf die Festphasen-Extraktions-Säulen (Supelclean™ LC-18 SPE Tubes, 1 ml; Supelco, Supelco Park; Bellefonte, PA, USA) zur Konditionierung zuerst zweimal je 1 ml Methanol, sowie zweimal je 1 ml a.d. pipettiert, gefolgt von der Beladung mit zweimal je 1 ml des Probenüberstandes, wobei als interner Standard 15 μ l 4-Pregnen-11 β ,21-diol-3,20-dion (Corticosteron 0,26 mol/l) mitgeführt wurde. Dann wurden die Säulen mit zweimal je 1 ml a.d. gewaschen. Schließlich erfolgte die Elution der Proben mit zweimal je 1 ml Methanol und das Eintrocknen der aufgefangenen Proben unter Stickstoffbegasung bei einer Temperatur von 45-50°C für die Dauer von 2-3 Stunden.

Zur Messung wurden die Proben mit 250 μ l der mobilen Phase (bestehend aus 65,5% Wasser, 27,5% Methanol und 7% Tetrahydrofuran) aus der Festphase gelöst und ein Probenvolumen von 20 μ l auf die Chromatographie-Säule (Kromasil 100, C 18, 5 μ m [300 x 4,0] mm) aufgetragen und anschließend im HPLC-Gerät gemessen. Die Detektion der verschiedenen Testosteron-Metaboliten erfolgte bei einer Wellenlänge von 254 nm, wobei die verschiedenen Metaboliten anhand der unterschiedlichen Laufzeiten identifiziert und die Peak-Flächen in Relation zu der des internen Standards (Corticosteron) berechnet wurden.

3.4.5. Morphologie

3.4.5.1. Herstellung der Gewebeschnitte

Nach Beendigung des jeweils letzten Diureseversuches wurden die Ratten in Ethernarkose durch Dekapitierung getötet und vollständig entblutet. Das Blut wurde zur Gewinnung des Serums aufgefangen. Danach wurden zwei etwa 3 mm dicke Scheiben jeweils aus der Mitte der Niere und aus dem linkslateralen Leberlappen für die histologischen Untersuchungen entnommen und über drei Tage in Formalin fixiert. Die dafür benötigten Materialien und alle weiteren nicht deklarierten Chemikalien stammten von der Firma Sigma (Sigma-Aldrich Chemie, München, Deutschland).

Die Organscheiben wurden jeweils in einem Block in Paraffin eingebettet. Anschließend wurden mit dem Mikrotom (Rotationsmikrotom HM 335 E, Microm Laborgeräte; Walldorf, Deutschland) 5 μ m dicke Schnitte angefertigt und auf Objektträger aufgebracht.

3.4.5.2. Immunhistochemie

Die Anwesenheit, die Lokalisation sowie die Ausprägung von Isoenzymen des Cytochrom P450-Systems in den Gewebeschnitten wurden immunhistochemisch bestimmt. Zur Anwendung kam hierbei eine indirekte Immunperoxidase-Färbung nach Smolowitz et al. (1991) unter Verwendung von Ziegen-Antikörpern gegen CYP 1A1, CYP 2B1, CYP 2E1, CYP 3A2 und CYP 4A1 der Ratte (Daichi Pure Chemicals; Tokyo, Japan) in einer Verdünnung von 1:5000 in 1% RSA/PBS-Puffer.

Die Immunhistochemie funktioniert nur im wässrigen Milieu, so dass die im hydrophoben Paraffin eingebetteten Gewebeschnitte zuerst rehydratisiert werden mussten.

Anschließend wurden die Schnitte 5 min lang in PBS mit 1% RSA inkubiert und dann einzeln im Shandon®-Färbesystem (Shandon GmbH Frankfurt a.M., Deutschland) eingespannt. Das Shandon®-Färbesystem besteht aus einer Kunststoff-Box, in deren oben liegende Öffnungen die Objektträger eingespannt werden, so dass dazwischen ein kapillärer, nach unten offener Hohlraum entsteht. In diesen werden die gewünschten Substanzlösungen eingebracht.

Jeder Gewebeschnitt wurde mit 0,3 ml Anti-Ratten-CYP-Antikörper von der Ziege versetzt. Zusätzlich wurde eine Kontrolle ohne Antikörperzugabe mitgeführt. Anschließend wurden die Objektträger über Nacht bei 4°C mit den Antikörpern inkubiert.

Am nächsten Tag erfolgte zuerst eine zweimalige Zugabe von 1,5 ml PBS/RSA-Puffer, um nicht gebundene Antikörper auszuwaschen. Dann wurden IgG-Antikörper vom Kaninchen, die gegen Ziegen-Antikörper gerichtet sind, zugesetzt und 20 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte erneut eine Waschung mit 1,5 ml PBS/RSA-Puffer, an die sich die Zugabe von peroxidasemarkierten Ziegen-Antikörpern gegen die zuvor aufgetragenen Kaninchen-Antikörper vom Typ IgG anschloss. Wiederum wurde für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend mit PBS/RSA-Puffer die überschüssigen Antikörper ausgewaschen.

Dann wurden für die Farbreaktion 0,15 ml des Substrats für die Peroxidase, hergestellt aus 20 ml a.d., 5 ml Peroxid-Puffer und 10 Tropfen Aminoethylcarbazol-(AEC) Chromogen, aufgetragen und nach 15 min erneut die gleiche Menge an AEC-Chromogen zugegeben. Nach weiteren 15 min Entwicklungszeit wurde das Präparat mit 1,5 ml a.d. gespült.

Für die Gegenfärbung mit Hämatoxylin wurden die Schnitte zweimal für jeweils 1 min in Wasser gewaschen. Anschließend erfolgte eine zehnminütige Inkubation in Meyer's Hämatoxylin. Danach wurde eine weitere zweieinhalbminütige Waschung in Wasser durchgeführt. Die Blaufärbung der Proben erfolgte durch sechsmaliges Tauchen in Ammoniakwasser bestehend aus 250 ml a.d. und 1,4 ml konzentrierter Ammoniaklösung.

Schließlich wurden die Präparate mit Glycerol eingedeckt und die Ränder mit Spezialkleber (Depex, Serva; Heidelberg, Deutschland) versiegelt.

3.4.5.3. Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung

Die Herstellung der Gewebeschnitte erfolgte wie in Kapitel 3.4.5.1. beschrieben. Die HE-Färbung wurde im wässrigen Milieu durchgeführt. Dazu wurden die Schnitte dreimal für jeweils 10 min in Xylol gewaschen, gefolgt von einer ebenfalls zehnminütigen Waschung in 100% Ethanol sowie zwei weiteren jeweils fünfminütigen Waschungen in 100% Ethanol. Nachdem die Gewebeschnitte zweimal je 2 min in

Wasser gespült worden waren, wurde 30 Minuten in Meyer's Hämatoxylin inkubiert. Danach erfolgte die 20 minütige Blaufärbung. Die Schnitte wurden für 2 min in a.d. gespült und daraufhin für 8 min in Eosin inkubiert. Zum Schluss wurden die Gewebeschnitte mit dem unter 3.4.5.2. genannten Spezialkleber und Deckgläschen abgedeckt und die Präparate getrocknet.

3.4.5.4. *Perjodsäure-Schiff (PAS) - Färbung*

Zuerst wurden die Gewebeschnitte dreimal 10 min in Xylol sowie weitere 10 min in 100% Ethanol gewaschen. Anschließend folgten zwei zweiminütige Spülungen mit a.d., bevor die Schnitte 10 min lang in 1%iger Perjodsäure inkubiert wurden. Danach wurden die Objektträger zweimal 5 min mit Wasser gespült und 30 min lang in Schiff'schem Reagenz inkubiert. Nach weiteren Spülungen wurden die Gewebeschnitte 30 min lang in Meyer's Hämatoxylin inkubiert und danach erneut 20 min lang mit Wasser gespült. Dann erfolgten Waschungen in 80% und 100% Ethanol. Nach 10 min Waschung in Xylol wurden die Präparate mit o.g. Spezialkleber und Deckgläschen bedeckt.

3.5. Statistik

Die Ergebnisse einer Versuchsgruppe von 40 Tieren sind als arithmetische Mittelwerte mit Standardfehler (S.E.M.) angegeben. Alle Volumen- und Mengenangaben wurden auf 100g Körpergewicht bezogen. Zum Nachweis signifikanter Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen wurde der t-Test für unabhängige Stichproben verwendet. Dabei wurde $p \leq 0,05$ als Signifikanzniveau festgelegt. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm SPSS 10.0.5 S für Windows. Die Erstellung der Diagramme wurde mit Hilfe des Programmes Excel 5.0 der Firma Microsoft® (USA) auf einem Computer vom Typ Pentium® III (Hyrican Informationssysteme, Deutschland) vorgenommen.

4. Ergebnisse

4.1. Versuchsreihe 1: 60 Tage alte weibliche Ratten

In Anlehnung an einen Versuch, welcher von Springate und Van Liew (1995) durchgeführt wurde, erhielten die Versuchstiere 8 mg IFO /100g KG intraperitoneal in vier Behandlungszyklen (einmal täglich an drei aufeinanderfolgenden Tagen pro Behandlungszyklus) mit einem Abstand von drei Wochen. Zwei Tage nach jedem Behandlungszyklus erfolgte ein Diureseversuch zur Bestimmung der Harnparameter.

4.1.1. Körpergewichtsentwicklung (Abb.1)

In der Gruppe der Kontrolltiere erhöhte sich das Körpergewicht durchschnittlich um 4% pro Woche bis zum Versuchsende. Die Tiere der IFO-Versuchsgruppe nahmen signifikant weniger an Gewicht zu. Nach dem 3. Zyklus sank das Gesamtgewicht dieser Tiere auf den Ausgangswert. Zwei Versuchstiere starben nach 4 Wochen, weitere zehn Ratten nach 7 Wochen.

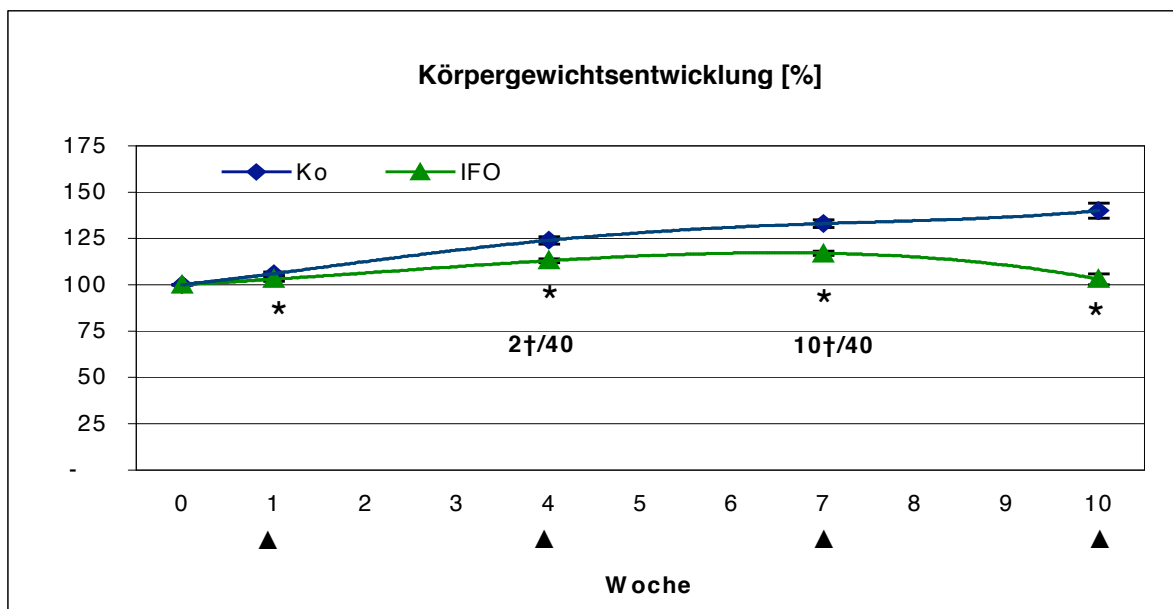


Abb.1:

Gewichtsentwicklung von 60 Tage alten weiblichen Ratten über 10 Wochen unter Applikation von 8mg IFO pro 100g KG in vier Zyklen [▲], Ko = Kontrolltiere, IFO = Versuchstiere, † = verstorbene Versuchstiere; arithmetische Mittelwerte \pm S.E.M.; n = 40; * - signifikanter Unterschied zur Kontrolle ($p \leq 0,05$).

Ergebnisse

4.1.2. Harnvolumen (Abb.2)

Das Harnvolumen der Kontrollgruppe lag über den gesamten Versuchszeitraum zwischen 0,5 und 0,7 ml/100g KG x h. Nach dem ersten IFO-Zyklus war das Harnvolumen der Versuchsgruppe gegenüber den Kontrollen signifikant erhöht. Im darauffolgenden Behandlungszyklus waren die Volumina der beiden Gruppen nahezu gleich groß. Nach dem dritten und vierten Zyklus lagen die Harnvolumina der Versuchsgruppe signifikant unter den Werten der Kontrollgruppe.

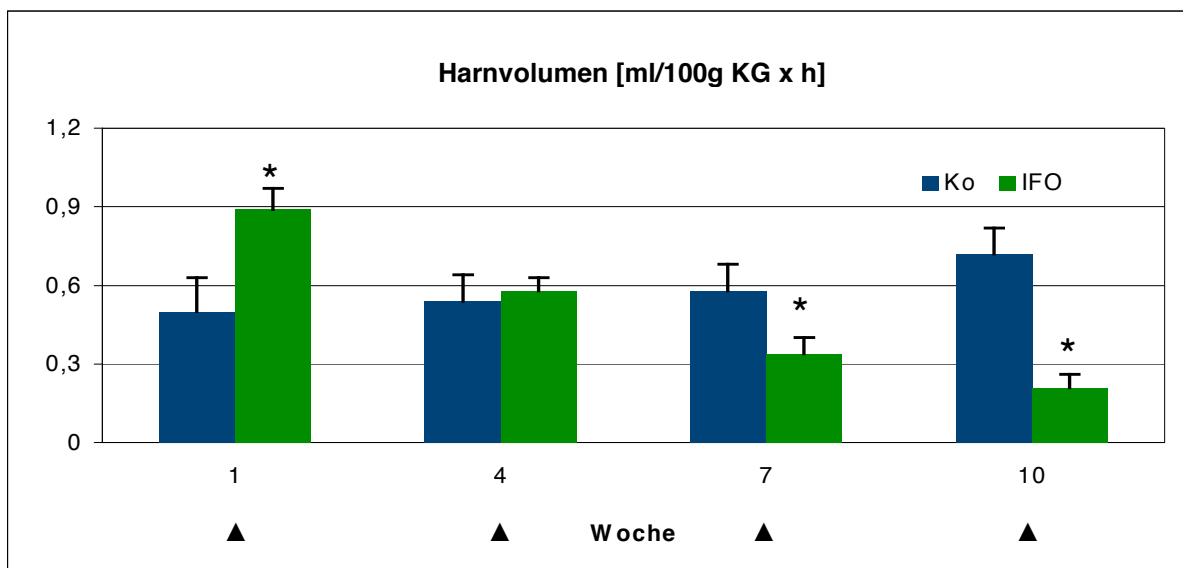


Abb.2:

Harnvolumen von 60 Tage alten weiblichen Ratten nach i.p. Flüssigkeitsbelastung (2,5ml 0,9% NaCl/100g KG). Ko = Kontrolltiere, IFO = Versuchstiere mit IFO-Behandlung von 8mg/100g KG in vier Zyklen [▲]; arithmetische Mittelwerte \pm S.E.M.; n = 40; * - signifikanter Unterschied zur Kontrolle ($p \leq 0,05$).

4.1.3. Kreatininclearance

Die Kreatininclearance betrug zehn Wochen nach Versuchsbeginn bei den Kontrolltieren $0,65 \pm 0,06$ ml/100g KG x min. Die Versuchstiere, welche mit 8mg IFO/100g KG behandelt worden waren, wiesen zur selben Zeit eine Kreatininclearance von $0,70 \pm 0,06$ ml/100gKG x min auf. Signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe lagen nicht vor. Daher wurde auf eine grafische Darstellung der Ergebnisse verzichtet.

4.1.4. Proteinausscheidung (Abb.3)

Der Kontrollbereich für die renale Proteinausscheidung lag bei 0,1mg/100g KG x h. Nach dem ersten Zyklus war die Proteinausscheidung in der IFO-Gruppe um 50% signifikant erhöht. Eine gesteigerte Proteinurie wurde in den darauffolgenden Untersuchungen nicht mehr festgestellt.

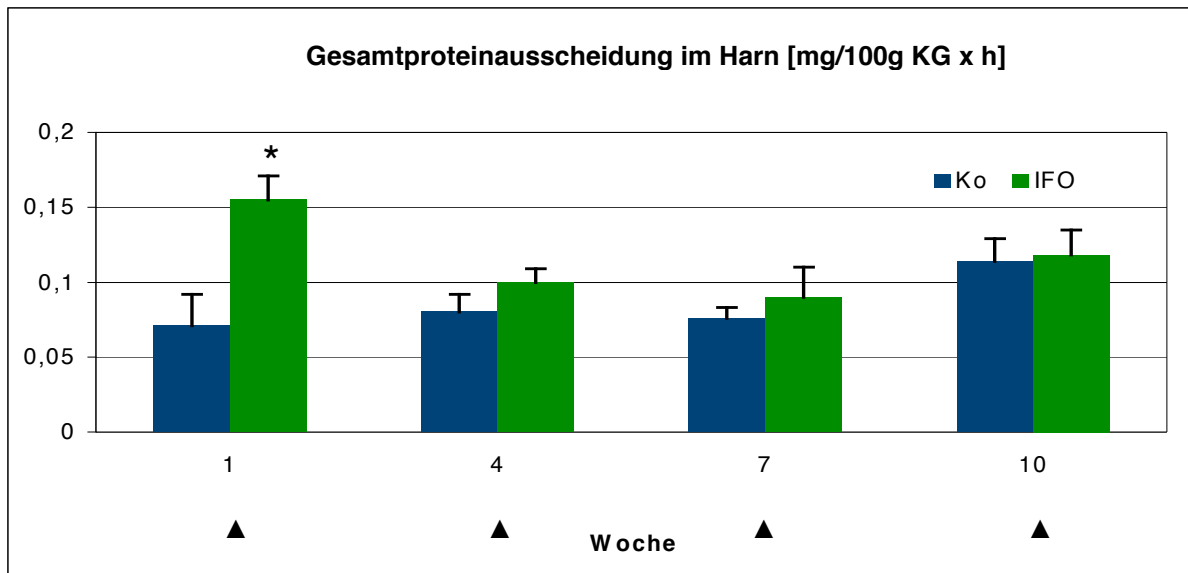


Abb.3:

Gesamtproteinmenge im Harn von 60 Tage alten weiblichen Ratten, die mit 8mg IFO/100g KG [▲] behandelt wurden. Ko = Kontrolltiere; arithmetische Mittelwerte \pm S.E.M.; n = 40; * - signifikanter Unterschied zur Kontrolle ($p \leq 0,05$).

4.1.5. Albuminausscheidung (Abb.4)

Die Kontrollgruppe schied über den gesamten Versuchsverlauf 2-3 μ g/100g KG x h Albumin in den Harn aus. Nach den ersten beiden Behandlungszyklen wurden im Harn der IFO-Versuchsgruppe signifikant erhöhte Albuminmengen nachgewiesen. Nach der dritten sowie der vierten IFO-Applikation befanden sich die Werte wieder im Kontrollbereich.

Ergebnisse

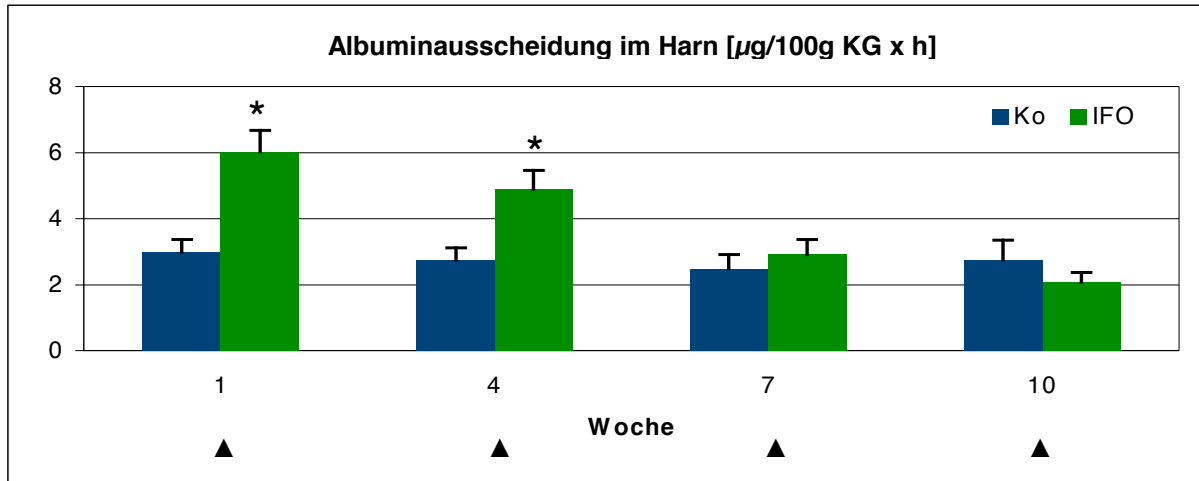


Abb.4:

Albuminausscheidung im Harn von 60 Tage alten weiblichen Ratten, die mit 8mg IFO/100g KG [▲] behandelt wurden. Ko = Kontrolltiere; arithmetische Mittelwerte \pm S.E.M.; $n = 40$; * - signifikanter Unterschied zur Kontrolle ($p \leq 0,05$).

4.1.6. Natriumausscheidung (Abb.5)

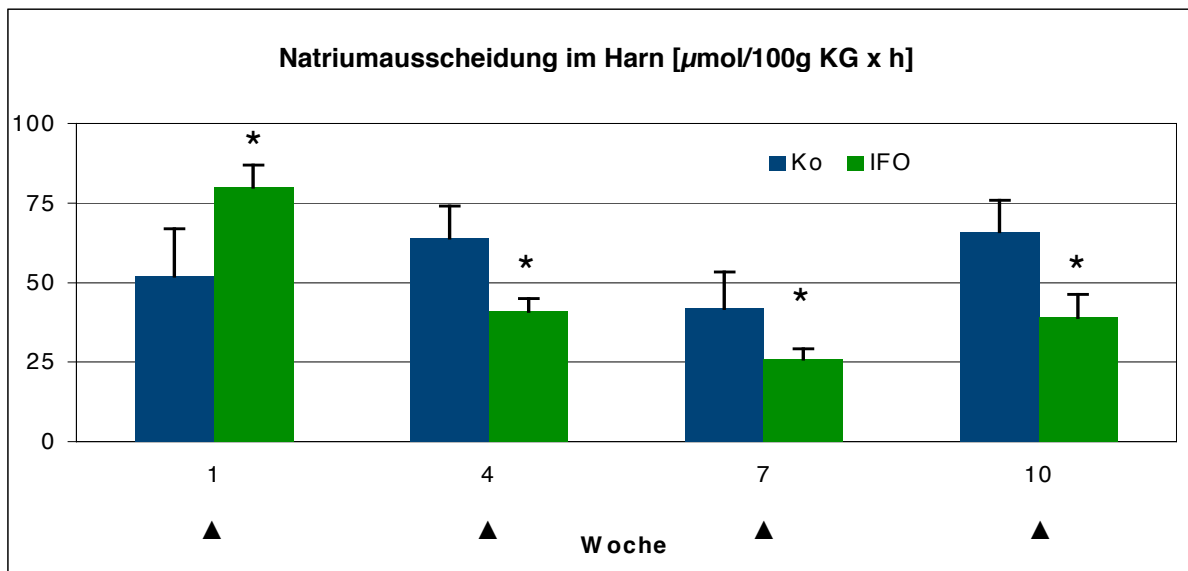


Abb.5:

Natriumausscheidung im Harn von 60 Tage alten weiblichen Ratten, die mit 8mg IFO/100g KG pro Zyklus [▲] behandelt wurden. Ko = Kontrolltiere; arithmetische Mittelwerte \pm S.E.M.; $n = 40$; * - signifikanter Unterschied zur Kontrolle ($p \leq 0,05$).

Die Natriummenge im Harn der Kontrolltiere lag im gesamten Versuchverlauf bei 50 $\mu\text{mol}/100\text{g KG} \times \text{h}$. Die Versuchstiere schieden nur nach der ersten IFO-Behandlung signifikant mehr Natrium aus. Nach den weiteren drei Zyklen lag die

Ergebnisse

Natriumausscheidung der IFO-Gruppe jeweils signifikant unterhalb des Kontrollbereiches.

4.1.7. Kaliumausscheidung (Abb.6)

Die Ausscheidung von Kalium verhielt sich analog zur Natriumausscheidung. Der Kontrollbereich lag bei $50 \mu\text{mol}/100\text{g KG} \times \text{h}$. Nach dem ersten Versuchszyklus war auch die Kaliumausscheidung im Harn der IFO-Gruppe signifikant um ca. 44% erhöht. Allerdings wurde nach den folgenden IFO-Zyklen signifikant weniger Kalium als bei Kontrollen ausgeschieden.

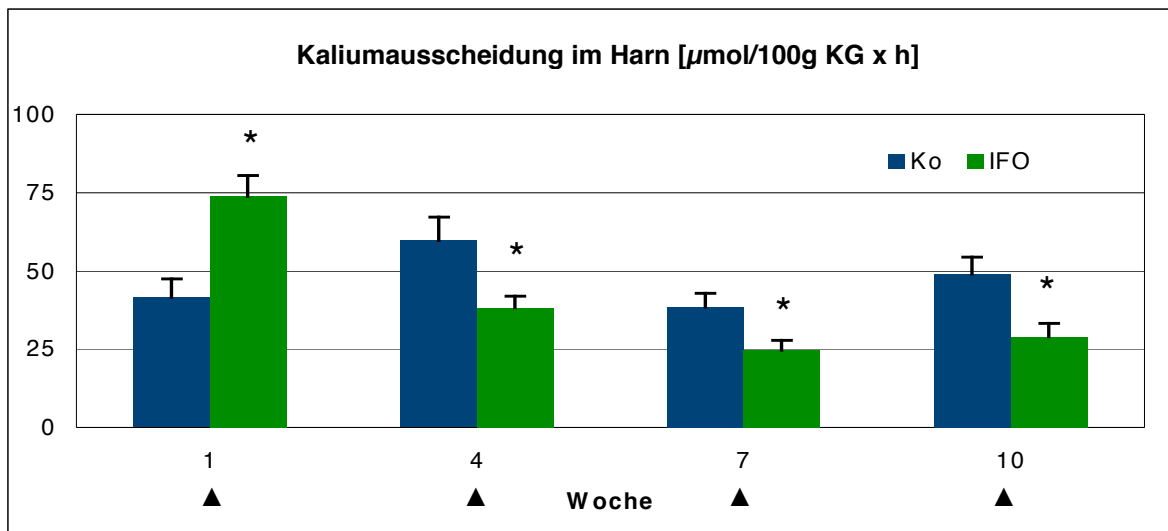


Abb.6:

Kaliumausscheidung im Harn von 60 Tage alten weiblichen Ratten, die mit $8\text{mg IFO}/100\text{g KG}$ [▲] behandelt wurden. Ko = Kontrolltiere; arithmetische Mittelwerte \pm S.E.M.; $n = 40$; * - signifikanter Unterschied zur Kontrolle ($p \leq 0,05$).

4.1.8. Phosphatausscheidung (Abb.7, 7a)

Die Phosphatausscheidung im Harn betrug bei Kontrolltieren etwa $0,5 \mu\text{mol}/100\text{g KG} \times \text{h}$. Die IFO-Gruppe schied nach dem ersten Behandlungszyklus signifikant mehr Phosphat aus (Abb.7). Nach dem 2. Zyklus war die Phosphatausscheidung nicht mehr signifikant erhöht und ab dem 3. Zyklus lag sie im Bereich der Kontrolltiere. In der akuten Phase nach dem ersten Behandlungszyklus wurden sieben der vierzig Versuchstiere mit einer erhöhten Phosphatausscheidung im Harn beobachtet. In den folgenden zwei Zyklen verringerte sich die Zahl der Tiere mit erhöhter

Ergebnisse

Phosphatausscheidung auf drei. Zwei der IFO-behandelten Tiere zeigte auch nach der letzten Applikation erhöhte Phosphatmengen im Harn (Abb.7a).

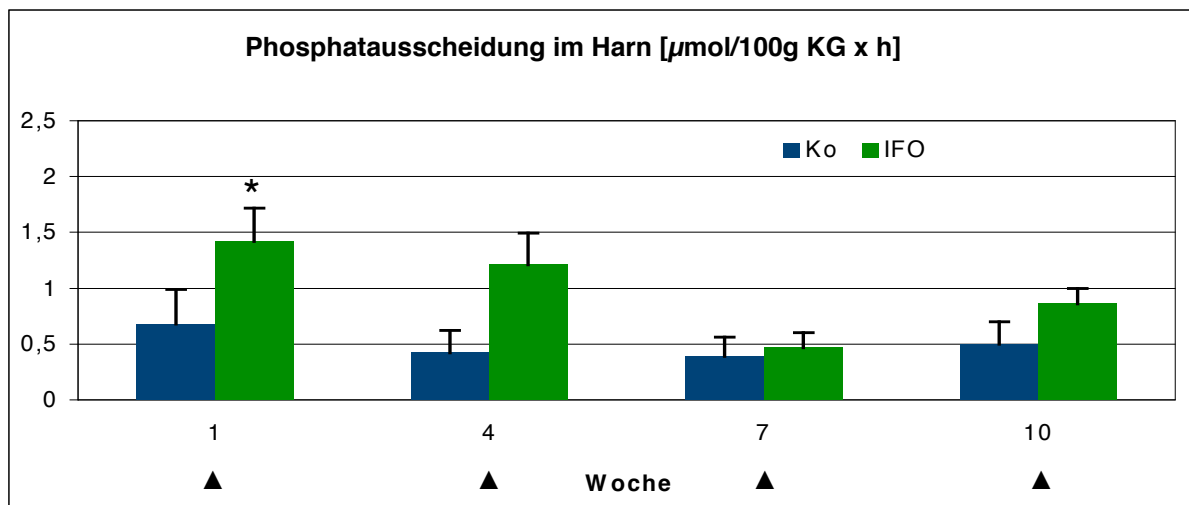


Abb.7:

Phosphatausscheidung im Harn von 60 Tage alten weiblichen Ratten, die mit 8mg IFO/100g KG [▲] behandelt wurden. Ko = Kontrolltiere; arithmetische Mittelwerte \pm S.E.M.; n = 40; * - signifikanter Unterschied zur Kontrolle ($p \leq 0,05$).

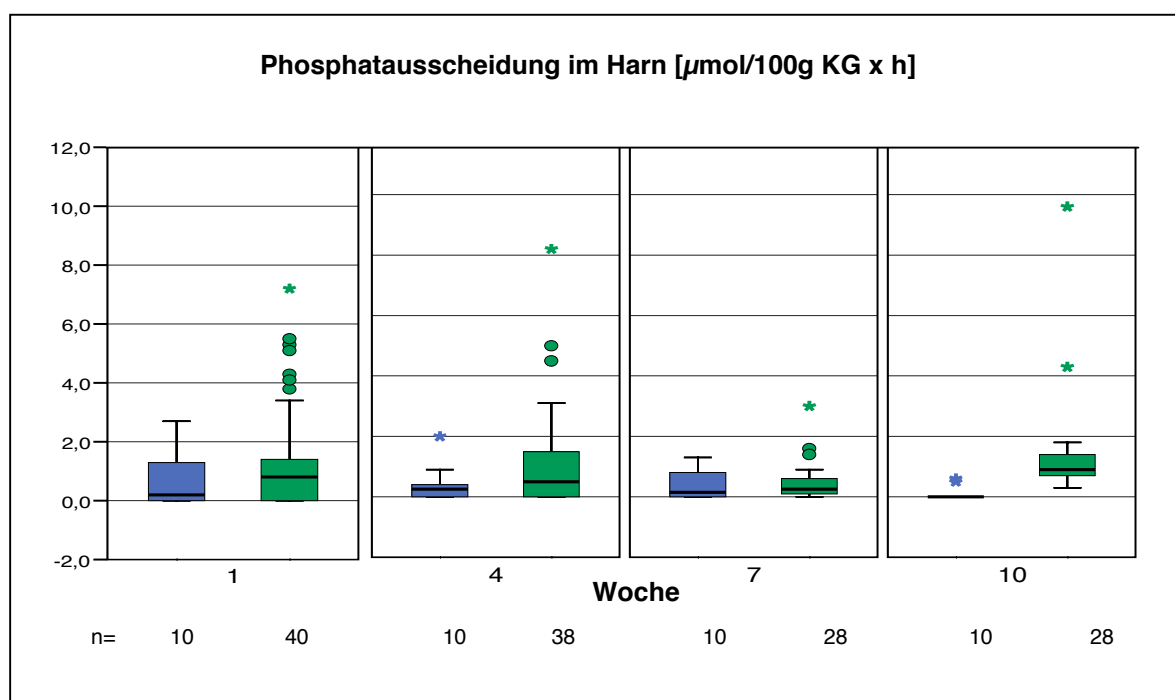


Abb.7a:

Phosphatausscheidung im Harn (Boxplots mit Median, Interquartilabstand und Extremwerten ●, ●, sowie Ausreißern *, *) von 60 Tage alten weiblichen Ratten, die mit 8mg IFO/100g KG behandelt wurden (grün); Kontrolltieren (blau) wurde 0,9%ige NaCl-Lösung appliziert.

4.1.9. Glukoseausscheidung (Abb.8)

Die im Harn ausgeschiedene Glukosemenge lag bei Kontrollen über den gesamten Beobachtungszeitraum zwischen 0,2 und 0,35 $\mu\text{mol}/100\text{g KG} \times \text{h}$. Nach den ersten beiden Behandlungszyklen schieden die Tiere der IFO-Gruppe Glukose im gleichen Maße in den Urin aus wie die Kontrolltiere. Dagegen wurden von den IFO-Tieren nach dem 3. und 4. Zyklus signifikant geringere Glukosemengen im Harn ausgeschieden.

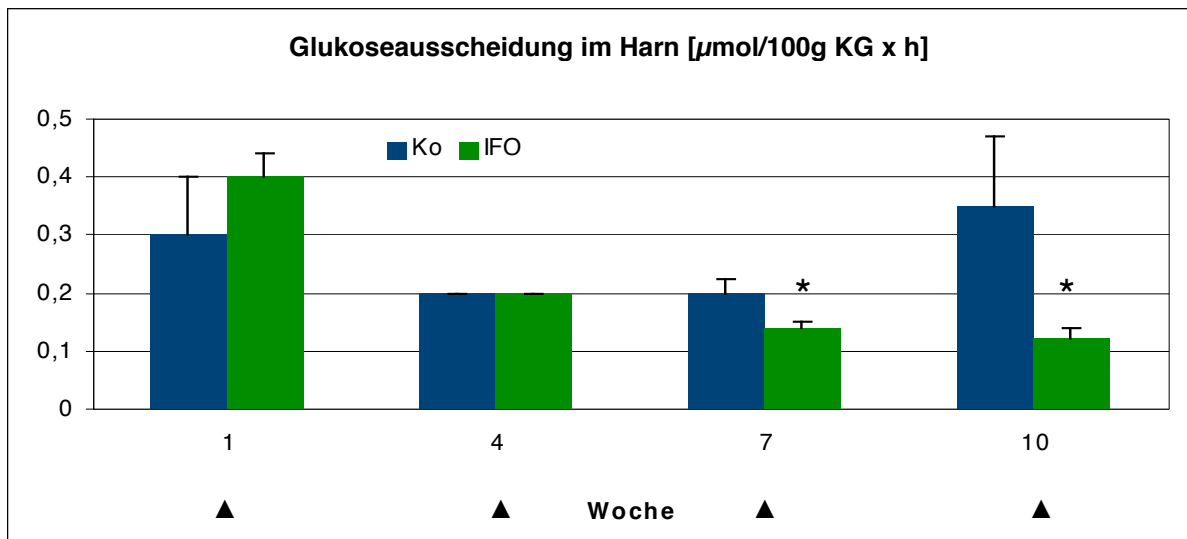


Abb.8:

Glukoseausscheidung im Harn von 60 Tage alten weiblichen Ratten, die mit 8mg IFO/100g KG [▲] behandelt wurden. Ko = Kontrolltiere; arithmetische Mittelwerte \pm S.E.M.; n = 40; * - signifikanter Unterschied zur Kontrolle ($p \leq 0,05$).

4.2. Versuchsreihe 2: 20 Tage alte weibliche Ratten

Da das Ifosfamid-induzierte Fanconi-Syndrom vorrangig bei Kindern auftritt (Loebstein et al. 1999), wurden für den folgenden Versuch weibliche Jungtiere im Alter von zwanzig Tagen bei Versuchsbeginn mit 8mg IFO/100g KG behandelt. Fünf Behandlungszyklen fanden im zweiwöchigen Abstand statt. Die Gewichtsentwicklung wurde über einen Zeitraum von 28 Wochen beobachtet. Die übrigen Parameter wurden in Diureseversuchen (D_1 - D_5) nach dem letzten Behandlungszyklus am Ende des 1., 2., 3., 4. und 5. Monats bestimmt.

4.2.1. Körpergewichtsentwicklung (Abb.9)

Anfangs wurde ein erwartungsgemäß starker Gewichtszuwachs beider Gruppen beobachtet. Das Körpergewicht der IFO-Tiere erhöhte sich allerdings signifikant geringer. In der 12. und 13. Woche stagnierte die Gewichtsentwicklung der IFO-Gruppe und nahm danach bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes wieder zu. Im Verlauf dieser Versuchsreihe starben sechs Tiere.

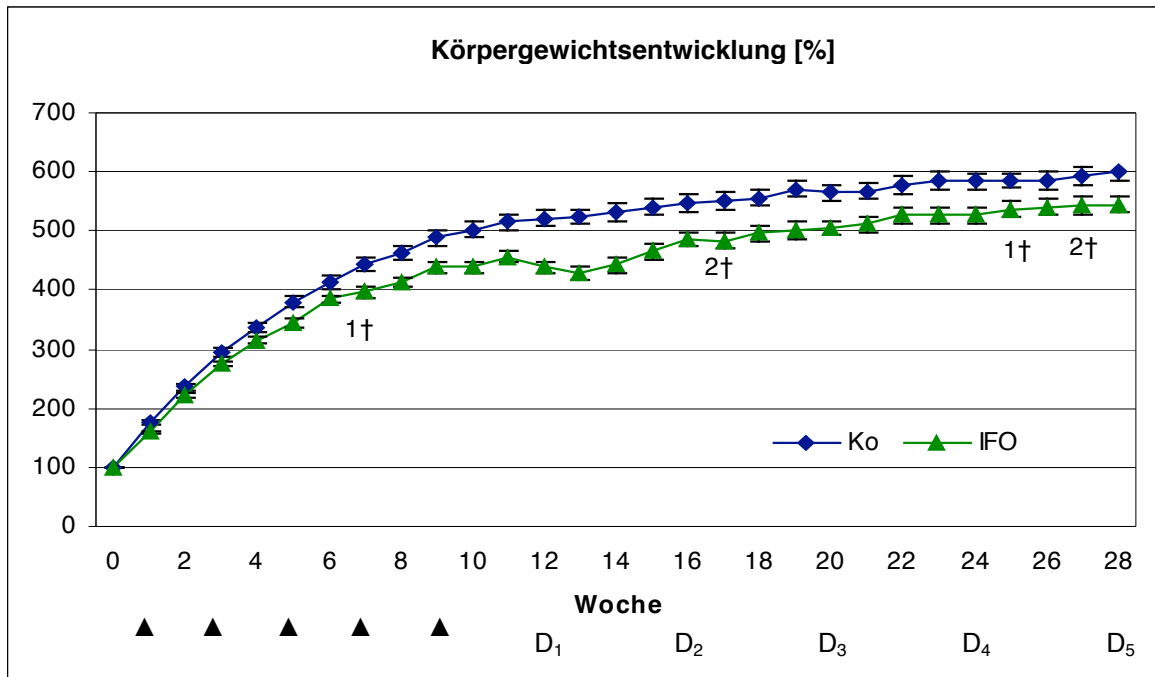


Abb.9:

Einfluss von Ifosfamid (8mg / 100g KG in fünf Zyklen [▲]) auf die Entwicklung des Körpergewichtes 20 Tage alter weiblicher Ratten bis 28 Wochen nach Versuchsbeginn. D₁ - D₅ = Diureseversuche; Ko = Kontrolltiere; † - verstorbene Tiere; arithmetische Mittel ± S.E.M.; n = 40.

4.2.2.Harnvolumen (Abb.10)

Das Harnvolumen der Kontrolltiere lag im Beobachtungszeitraum zwischen 0,2 und 0,55ml/100g KG x h. Die ausgeschiedene Harnmenge der Versuchsgruppe IFO war während der ersten beiden Monate nach der letzten IFO-Behandlung im Kontrollbereich. Im dritten Monat waren die Werte der IFO-Gruppe signifikant niedriger. Danach befanden sich die Harnvolumina der IFO-Gruppe wieder im Bereich der Kontrolltiere.

Ergebnisse

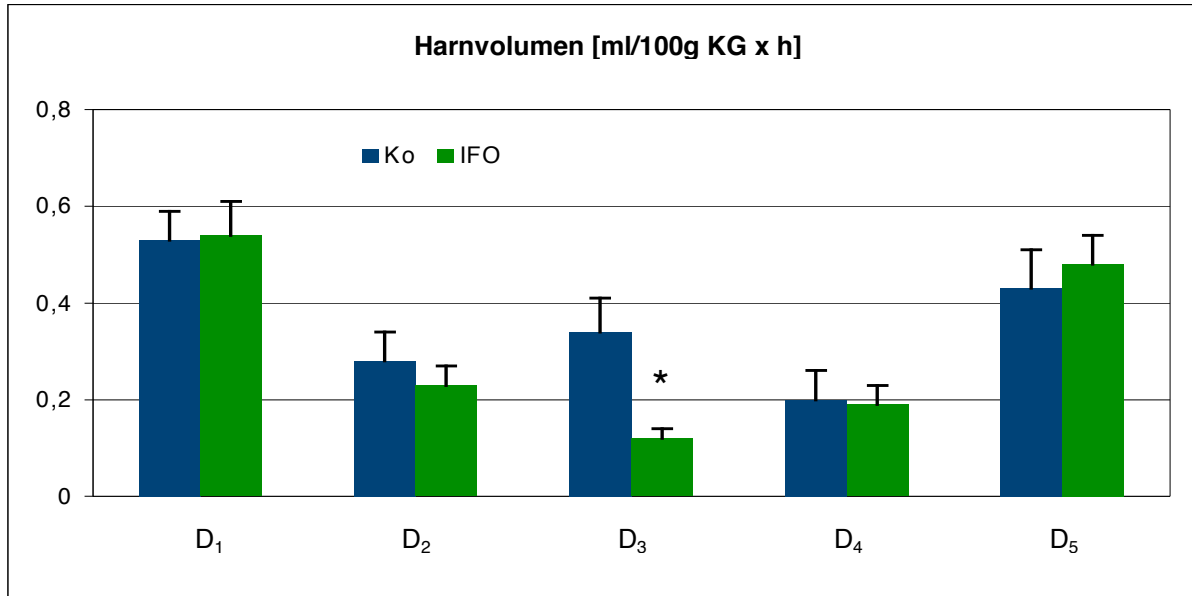


Abb.10:

Harnvolumen von 20 Tage alten weiblichen Ratten nach i.p. Flüssigkeitsbelastung (2,5 ml 0,9% NaCl/100g KG). D₁ - D₅ = Diureseversuche; Ko = Kontrolltiere; IFO = Versuchstiere mit IFO-Behandlung von 8 mg/100g KG); arithmetische Mittelwerte ± S.E.M.; n = 40; * - signifikanter Unterschied zur Kontrolle (p ≤ 0,05).

4.2.3. Kreatininclearance

Die Kreatininclearance betrug 5 Monate nach Abschluss der Versuche 0,59ml/100g KG x min bei der Kontrollgruppe. Die Kreatininclearance (0,57 ± 0,03ml/100g KG x min) der IFO-Gruppe unterschied sich nicht signifikant, weswegen auf eine Darstellung verzichtet wird.

4.2.4. Proteinausscheidung (Abb.11)

Die Kontrolltiere schieden in den fünf Monaten nach der IFO-Behandlung etwas mehr als 0,05mg/100g KG x h Protein im Harn aus. Die Proteinausscheidung der IFO-Gruppe war im ersten Diureseversuch mit 0,11mg/100g KG x h signifikant höher. In den darauffolgenden Diureseversuchen unterschied sie sich nicht von den Kontrollen.

Ergebnisse

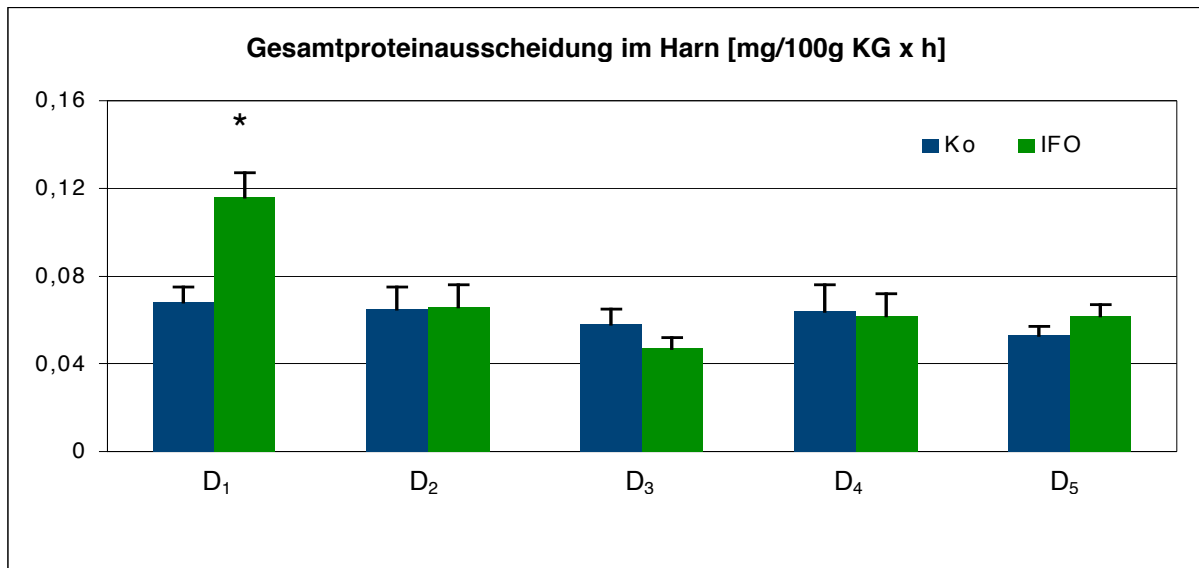


Abb.11:

Gesamtproteinausscheidung im Harn von 20 Tage alten weiblichen Ratten, die monatlich nach Abschluss einer Behandlung mit 8mg IFO/100g KG über fünf Monate gemessen wurde. D₁ - D₅ = Diureseversuche; Ko = Kontrolltiere; arithmetische Mittelwerte \pm S.E.M.; n = 40; * - signifikanter Unterschied zur Kontrolle ($p \leq 0,05$).

In dieser Versuchsreihe erfolgte keine separate Bestimmung der Albuminausscheidung.

4.2.5. Natriumausscheidung (Abb.12)

Die renale Natriumausscheidung in Kontroll- und Versuchsgruppe waren einander sehr ähnlich. Signifikante Unterschiede wurden nicht festgestellt, die Natriumwerte lagen in jedem der fünf Diureseversuche im Kontrollbereich.

4.2.6. Kaliumausscheidung (Abb.13)

Die Werte für die Kaliumausscheidung verhielten sich analog zu denen der Natriumausscheidung in dieser Versuchsreihe. Die Ausscheidungen in beiden Gruppen ähnelten einander. Signifikante Unterschiede wurden nicht errechnet.

Ergebnisse

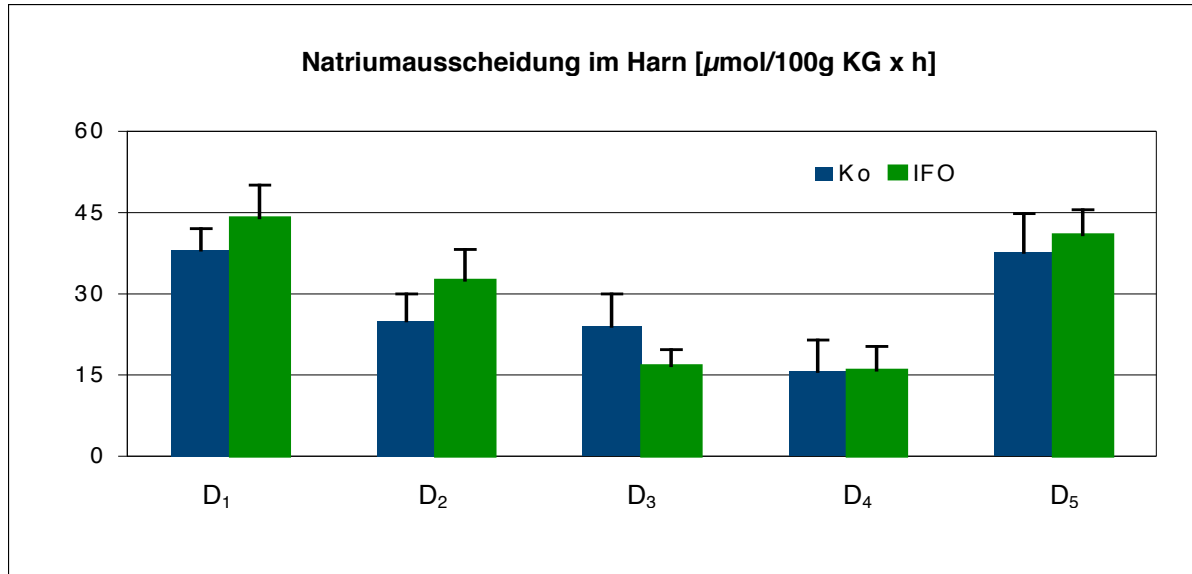


Abb.12:

Natriumausscheidung im Harn von 20 Tage alten weiblichen Ratten, die monatlich nach Abschluss einer Behandlung mit 8mg IFO/100g KG über fünf Monate gemessen wurde. D₁ - D₅ = Diureseversuche; Ko = Kontrolltiere; arithmetische Mittelwerte \pm S.E.M.; n = 40.

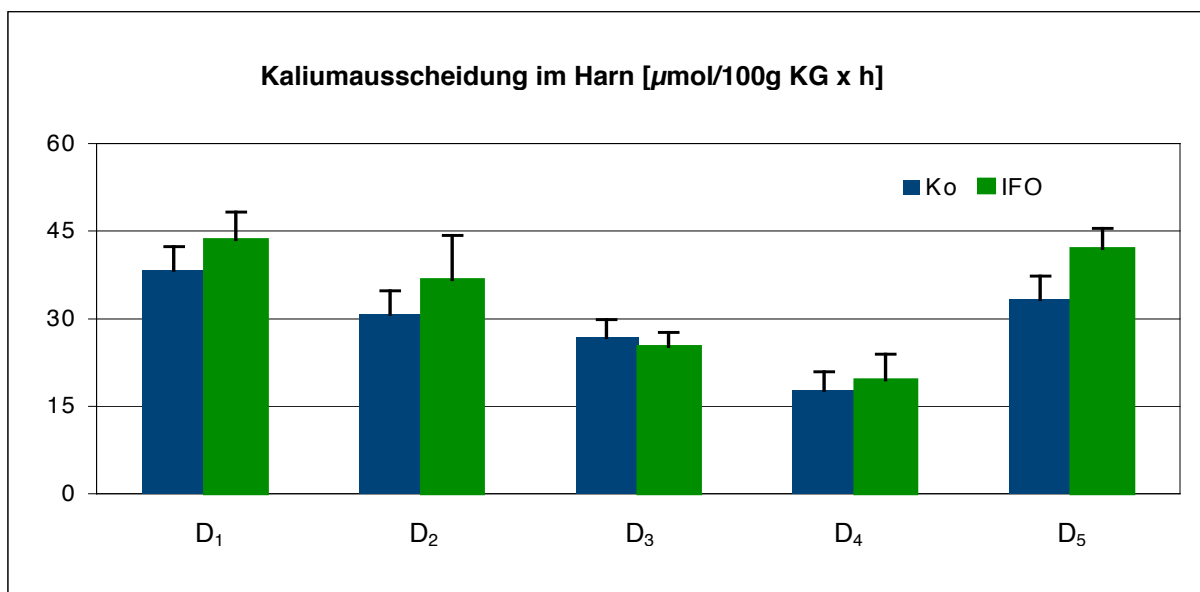


Abb.13:

Kaliumausscheidung im Harn von 20 Tage alten weiblichen Ratten, die monatlich nach Abschluss einer Behandlung mit 8mg IFO/100g KG über fünf Monate gemessen wurde. D₁ - D₅ = Diureseversuche; Ko = Kontrolltiere; arithmetische Mittelwerte \pm S.E.M.; n = 40.

4.2.7. Phosphatausscheidung (Abb.14)

In jedem der Diureseversuche lag die ausgeschiedene Phosphatmenge im Bereich der Kontrollgruppe. Es wurden keine signifikanten Unterschiede nachgewiesen.

Ergebnisse

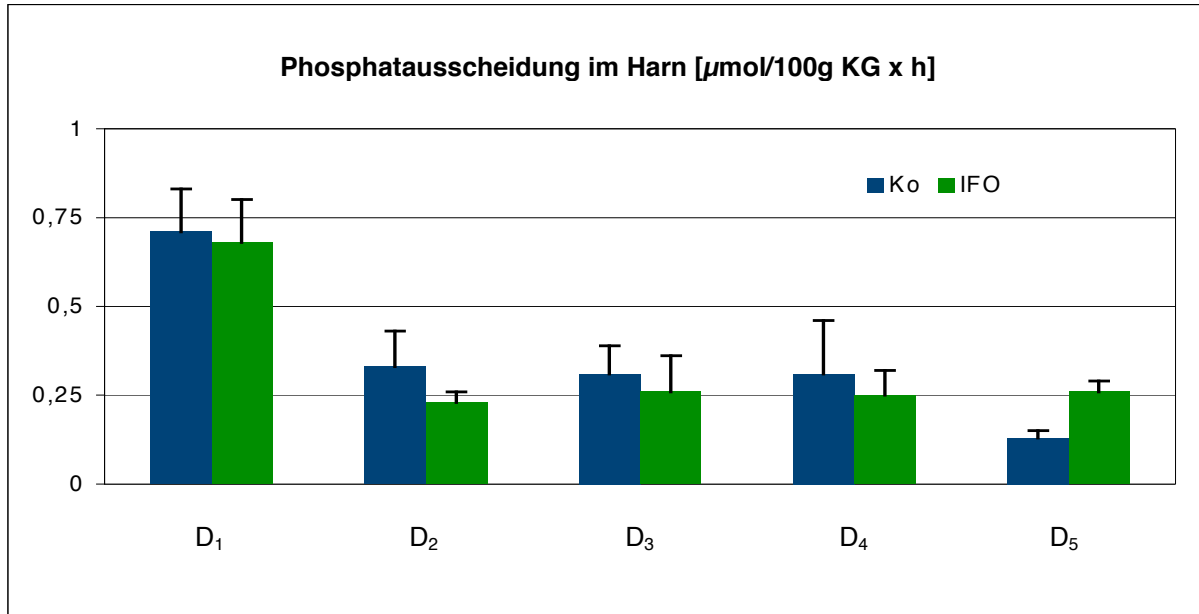


Abb.14:

Phosphatausscheidung im Harn von 20 Tage alten weiblichen Ratten, welche monatlich nach Abschluss einer Behandlung mit 8mg IFO/100g KG über fünf Monate gemessen wurde. D₁ - D₅ = Diureseversuche; Ko = Kontrolltiere; arithmetische Mittelwerte \pm S.E.M.; n = 40.

4.2.8. Glukoseausscheidung (Abb.15)

Die renal ausgeschiedene Glukosemenge betrug bei den Kontrollen ca. 0,25-0,75 $\mu\text{mol}/100\text{g KG} \times \text{h}$. Die IFO-Gruppe unterschied sich davon nicht signifikant.

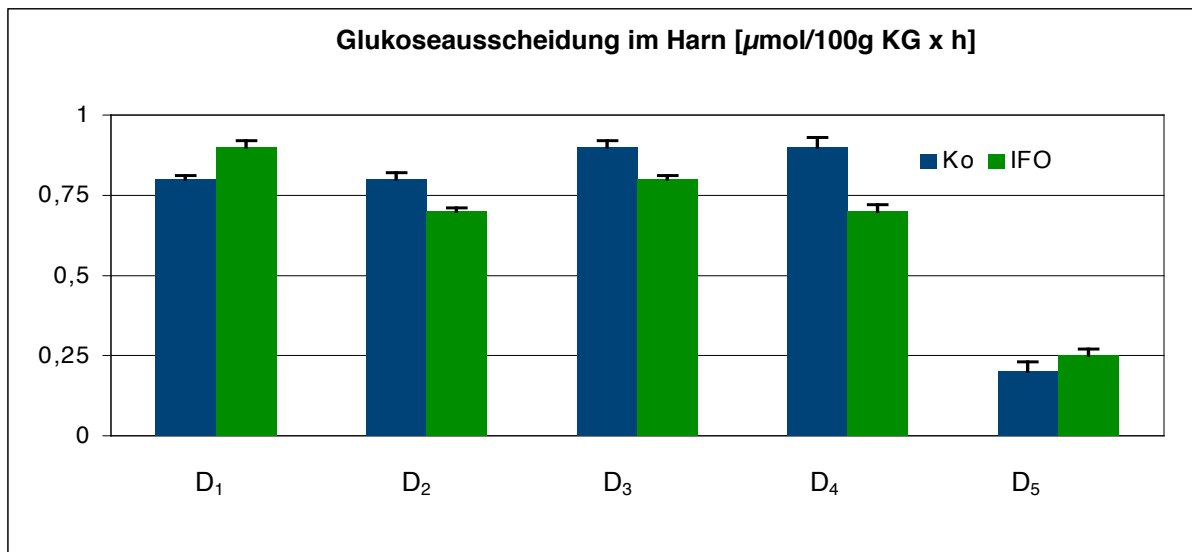


Abb.15:

Glukoseausscheidung im Harn von 20 Tage alten weiblichen Ratten, die monatlich nach Abschluss einer Behandlung mit 8mg IFO/100g KG über fünf Monate gemessen wurde. D₁ - D₅ = Diureseversuche; Ko = Kontrolltiere; arithmetische Mittelwerte \pm S.E.M.; n = 40.

4.3. Versuchsreihe 3: 30 Tage alte männliche Ratten

Da nicht IFO selbst sondern seine Metabolite für die nephrotoxische Wirkung verantwortlich gemacht werden (Mohrmann et al. 1994, Germann et al. 2005), wurde im folgenden Versuch männlichen Jungtieren eine Dosis von 6mg IFO/100gKG i.p. (vier Behandlungszyklen im Abstand von zwei Wochen) appliziert. Männliche Ratten besitzen gegenüber weiblichen Versuchstiere eine höhere Biotransformationskapazität (Klinger 1998). Vierzehn Wochen nach Behandlungsbeginn wurde ein Diureseversuch durchgeführt, um die Parameter der Nierenfunktion zu bestimmen.

4.3.1. Körpergewichtsentwicklung (Abb.16)

Die Kontrolltiere nahmen altersgemäß über den gesamten Beobachtungszeitraum zu. Die Körpergewichte der IFO-Gruppe entwickelten sich signifikant geringer.

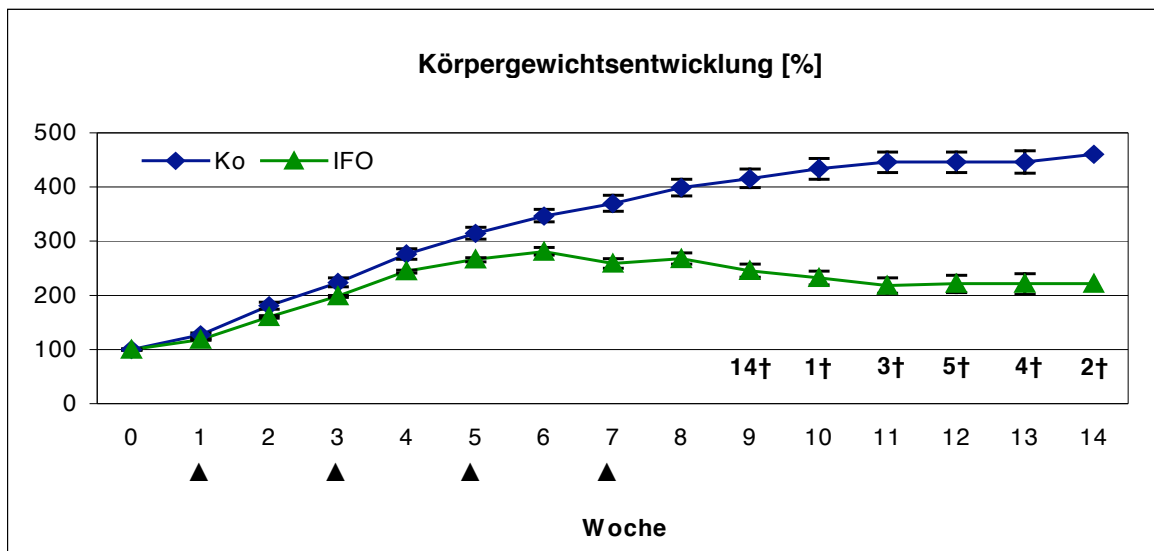


Abb.16:

Einfluss von 6mg IFO/100g KG in vier Zyklen [▲] auf die Entwicklung des Körpergewichts 30 Tage alter männlicher Ratten bis 14 Wochen nach Versuchsbeginn. Ko = Kontrolltiere; † - verstorbene Tiere; arithmetische Mittelwerte \pm S.E.M.; n = 40.

Alle Tiere nahmen aber auch bis zur 6. Versuchswoche zu. Nach dem 4. Behandlungszyklus stagnierte die Körpergewichtsentwicklung für zwei Wochen. Danach nahm das Körpergewicht der Versuchsgruppe von der 9. bis zur 11. Woche ab und änderte sich bis zum Ende des Versuchszeitraumes nicht mehr. Das

Ergebnisse

abnehmende Körpergewicht ging mit einer erhöhten Letalität einher. In der 9. Woche verstarben 14, in den darauf folgenden fünf Wochen weitere 15 Versuchstiere.

4.3.2. Parameter der Nierenfunktion (Tab.1)

Sieben Wochen nach der letzten IFO-Gabe wurden das Harnvolumen, die Kreatininclearance, sowie die renale Ausscheidung von Gesamtprotein, Natrium, Kalium, Phosphat und Glukose bestimmt. Alle Werte außer Phosphat waren bei der IFO-Gruppe signifikant reduziert. Die Phosphatausscheidung im Harn lag ca. 50% über dem Kontrollwert. Der Unterschied war jedoch aufgrund der beträchtlichen Streuung der Werte nicht signifikant.

Tabelle 1:

Harnvolumen und Kreatininclearance sowie Ausscheidung von Gesamtprotein, Natrium, Kalium Phosphat und Glukose im Harn 30 Tage alter männlicher Ratten 14 Wochen nach Beginn der IFO-Applikation (6mg pro 100g KG); Ko = Kontrolltiere; n = 11; * - signifikanter Unterschied zur Kontrolle ($p \leq 0,05$).

Parameter	Ko	IFO
Harnvolumen [ml/100g KG x h]	0,46 ± 0,07	0,20 ± 0,05 *
Kreatininclearance [ml/100g KG x min]	0,70 ± 0,05	0,42 ± 0,09 *
Gesamtproteinausscheidung [mg/100g KG x h]	0,28 ± 0,03	0,08 ± 0,10 *
Natriumausscheidung [μmol/100g KG x h]	63 ± 9	33 ± 8 *
Kaliumausscheidung [μmol/100g KG x h]	43 ± 6	21 ± 4 *
Phosphatausscheidung [μmol/100g KG x h]	0,96 ± 0,27	1,40 ± 0,50
Glukoseausscheidung [μmol/100g KG x h]	0,24 ± 0,03	0,11 ± 0,30 *

4.3.3. Einfluss auf die Biotransformation (Abb.17)

Die Analyse des 9000g-Gewebeüberstandes, der sieben Wochen nach dem letzten Behandlungszyklus von männlichen Jungtieren aus Leber und Niere gewonnen wurde, ergab, dass der CYP-Gehalt im Gewebe der Versuchstiere gegenüber dem der Kontrollen unverändert war.

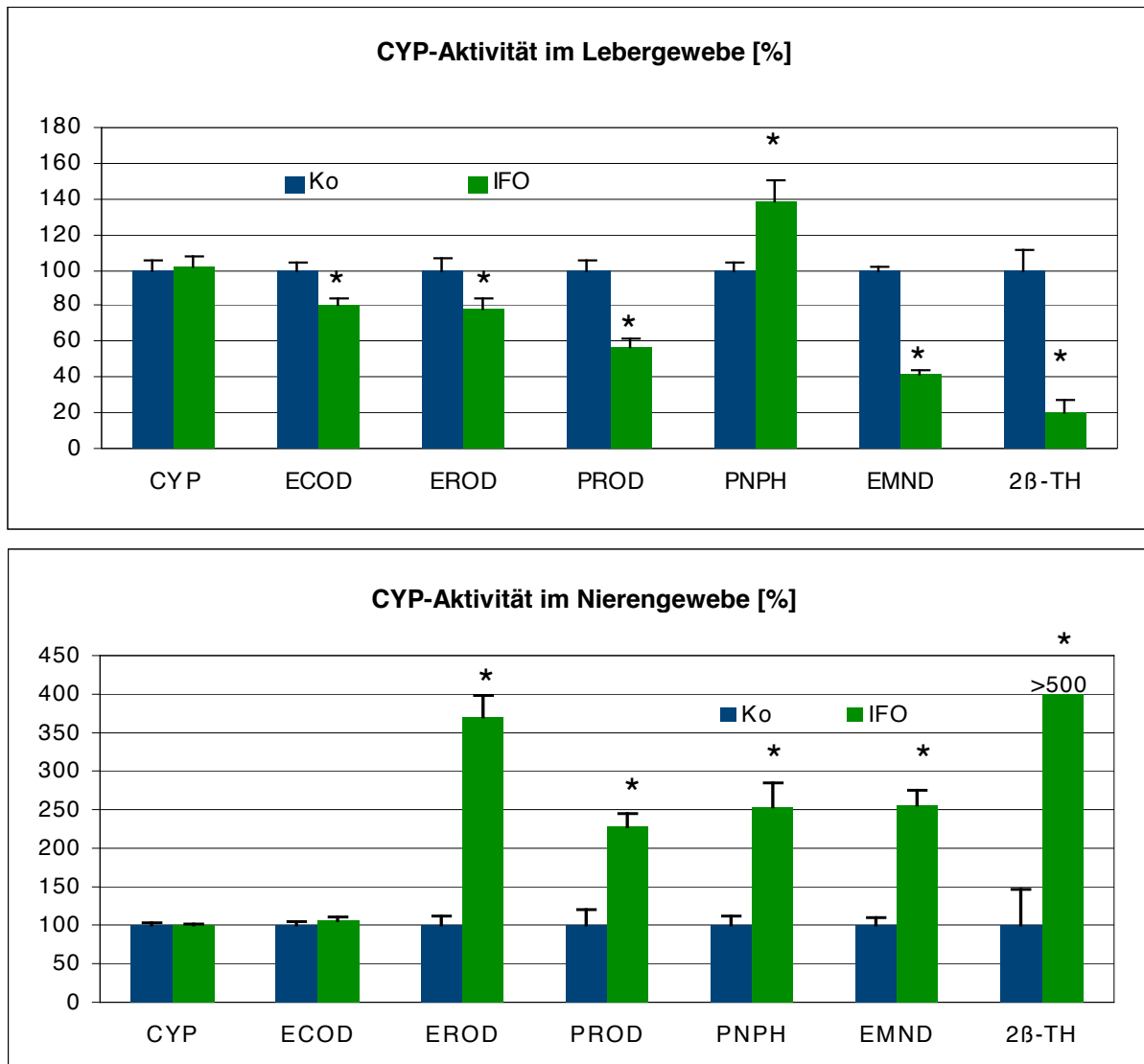


Abb.17

Cytochromgehalt und Aktivitäten der Cytochrom P450 (CYP)-Spezies im 9000g-Lebergewebeüberstand (oben) bzw. Nierengewebeüberstand (unten) männlicher Jungtiere sieben Wochen nach der letzten Behandlung mit 6mg IFO/100g KG x h. Ko = Kontrolltiere; CYP = Cytochrom P450-Gehalt; EROD = 7-Ethoxyresorufin-O-Deethylierung; PROD = 7-Pentoxyresorufin-O-Depentylierung; ECOD = 7-Ethoxycoumarin-O-Deethylierung; PNPH = p-Nitrophenol-Hydroxylierung; EMND = Ethylmorphin-N-Demethylierung; 2β-TH = 2β-Testosteron-Hydroxylase; arithmetische Mittelwerte ± S.E.M.; n = 11; * - signifikanter Unterschied zur Kontrolle (p ≤ 0,05).

Ergebnisse

Lebergewebe der IFO-behandelten Tiere wies für CYP 1A (EROD, ECOD), CYP 2B1/2 (PROD, ECOD) und CYP 3A (EMND, 2 β -TH) eine signifikant reduzierte Aktivität auf. Nur die durch PNPH ermittelte CYP 2E1-Aktivität war erhöht. Dagegen war die CYP-Aktivität, die nach IFO-Behandlung im Nierengewebe bestimmt wurde, mit Ausnahme der ECOD signifikant erhöht.

4.3.4. Histopathologische Ergebnisse (Abb.18-20)

Der Vergleich der Organgewichte ergab zwischen IFO-Gruppe und Kontrollen signifikante Unterschiede sowohl der Lebern als auch der Nieren. Bei der Kontrollgruppe wogen die Lebern $9,8 \pm 0,1\text{g}$, die der IFO-Gruppe hingegen lediglich halb so viel ($4,1 \pm 0,4\text{g}$). Die Nieren wogen bei den Kontrollen $1,1 \pm 0,03\text{g}$, die der IFO-Gruppe signifikant weniger ($0,6 \pm 0,02\text{g}$).

Die histologische Untersuchung ließ keine Unterschiede zwischen den Organpräparaten der beiden Tiergruppen in der Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung erkennen (nicht dargestellt). Die Perjodsäure-Schiff (PAS)-Färbung zeigte einen Glykogenverlust in den Lebern der IFO-behandelten Tiere (Abb.18). Nach Immunperoxidase-Färbung der Lebern der Kontrolltiere zeigten besonders die perivenösen Hepatozyten ein geringes Vorkommen von CYP 1A1, jedoch ein deutliches Vorhandensein der Isoformen CYP 2B1, 2E1, 3A2 und 4A1 (Abb.19A, C, E; Tabelle 2). Die IFO-Behandlung bewirkte eine deutliche Reduktion der CYP 1A1, 2B1 (Abb.19B) und 3A2-Expression in den Leberläppchen. Hingegen kam es zu einer deutlichen Immunperoxidase-Färbung der CYP-Isoformen 2E1 und 4A1 in den Hepatozyten des perivenösen Bereichs (Abb. 19D, F; Tabelle 2).

Die Glomerula der Kontrolltiere zeigten eine leichte Immunperoxidase-Färbung aller untersuchten CYP-Isoformen sowohl im Endothel als auch im Epithel der Glomerula (Abb.20A, C, E; Tabelle 3). Eine geringe bis moderate Expression von CYP 1A1, 2B1, 2E1 und 3A2 konnte im Tubulusepithel sowie in den Sammelrohren nachgewiesen werden, wobei die Immunperoxidase-Färbung von distalem Tubulus und Sammelrohr im Vergleich zum proximalen Tubulus deutlich stärker ausfiel. Regional sehr inhomogen war die Verteilung von CYP 4A1, welches sich gering bis deutlich in den Epithelzellen von Tubulus und Sammelrohr nachweisen ließ (Abb.20E).

Ergebnisse

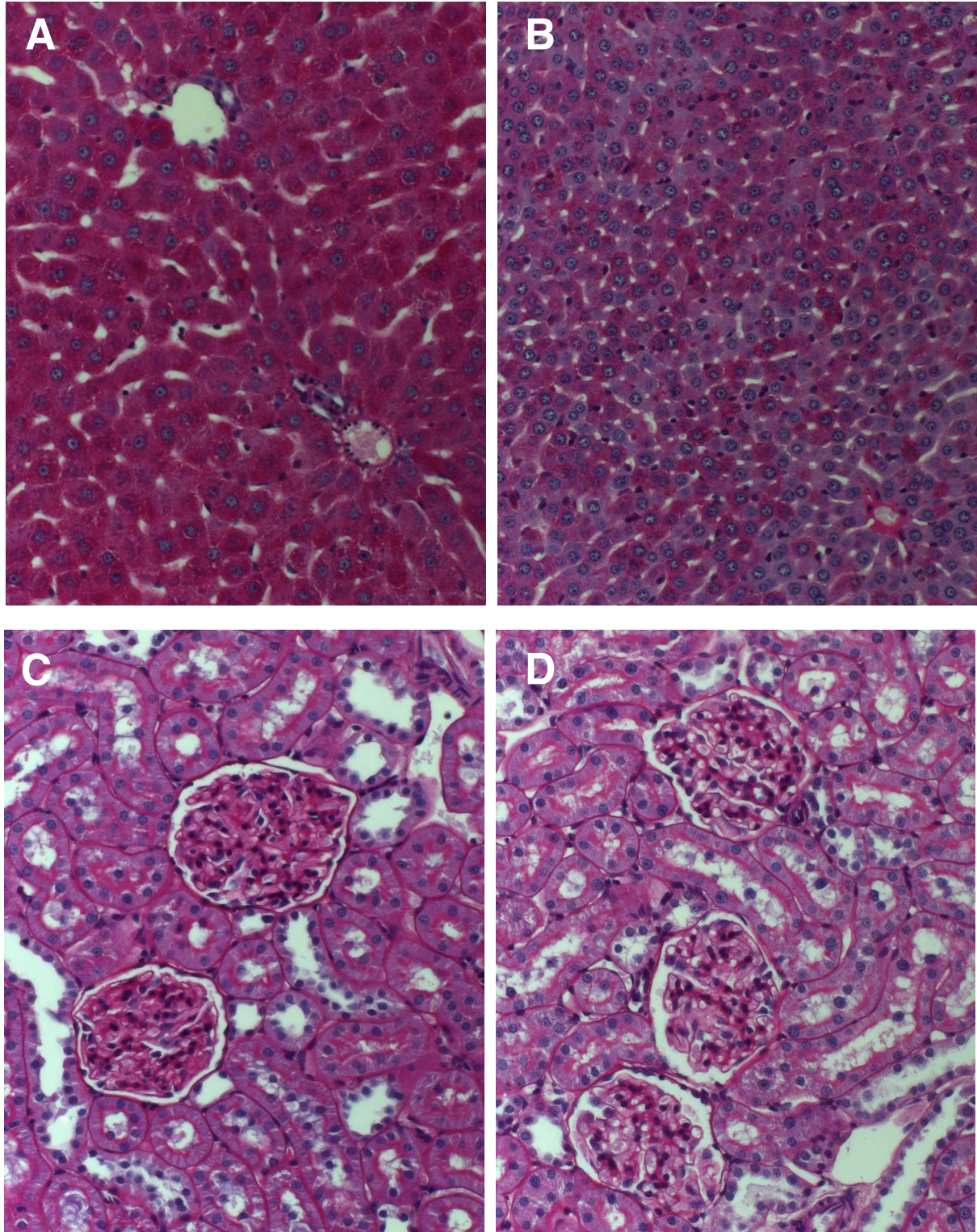


Abb.18:

Morphologie und Glykogengehalt von Leber (A, B) und Niere (C, D) junger männlicher Ratten. Kontrolltiere (A, C) wurden in vier Zyklen mit physiologischer Kochsalzlösung behandelt, IFO-Tiere (B, D) erhielten 6mg IFO/100g KG. Perjodsäure-Schiff (PAS)-Färbung; 200-fache Vergrößerung.

Ergebnisse

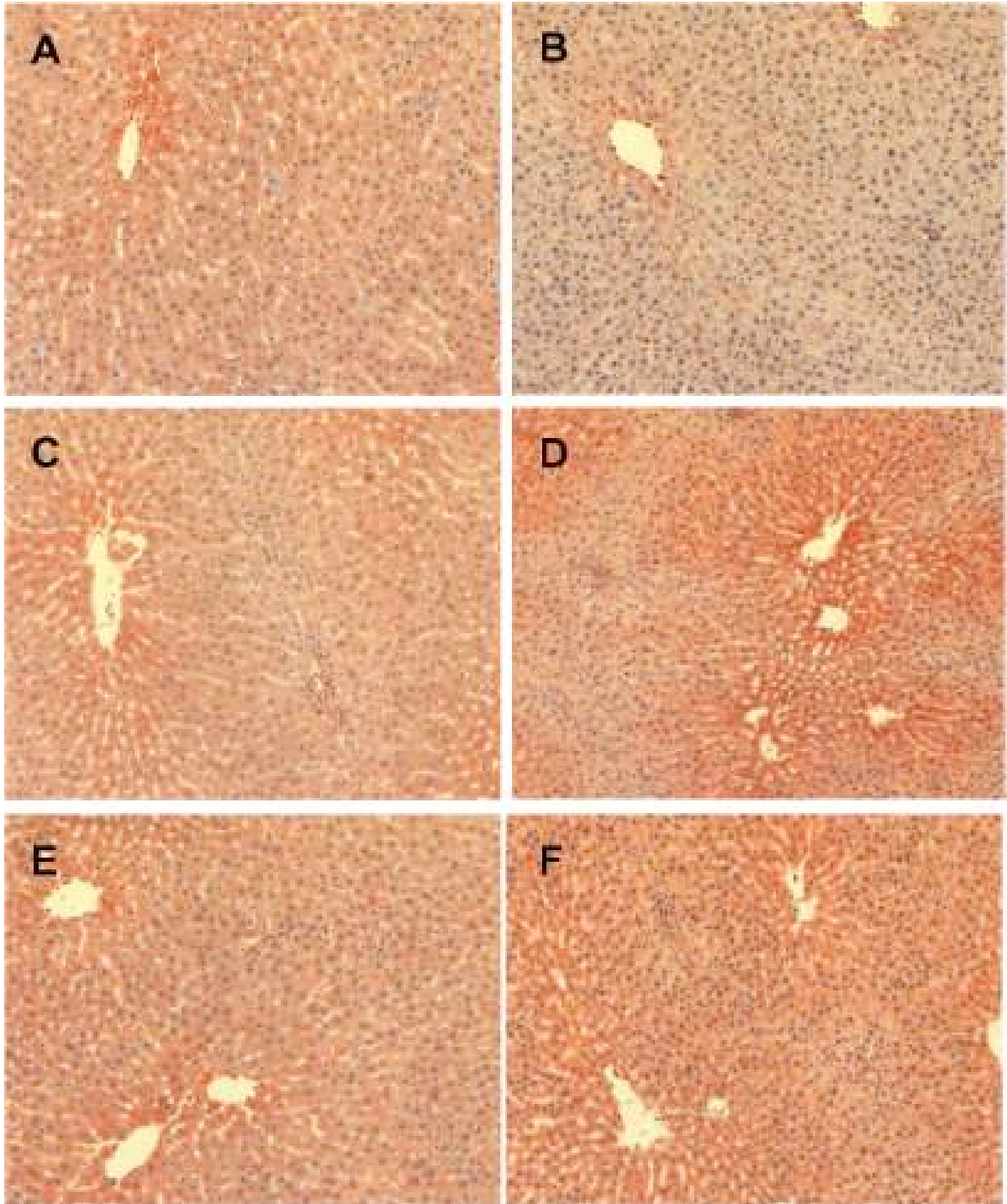


Abb.19:

Vorkommen der Cytochrom P (CYP) 450-Isoformen 2B1 (A, B), 2E1 (C, D) und 4A1 (E, F) (braune Färbung) in Lebern junger männlicher Ratten. Kontrolltiere (A, C, E) wurden in vier Zyklen mit physiologischer Kochsalzlösung behandelt, Tiere der IFO-Gruppe (B, D, F) erhielten 6mg IFO/100g KG. Immunperoxidase-Färbung; Gegenfärbung mit Hämatoxylin; 100-fache Vergrößerung.

Die Nieren der IFO-behandelten Ratten wiesen eine Zunahme aller untersuchten CYP-Isoformen auf. Besonders deutlich war die Färbung von CYP 2B1, 2E1 und 4A1

Ergebnisse

in Epithelzellverbänden der proximalen und distalen Tubuli sowie der Sammelrohre (Abb. 20B, D, F).

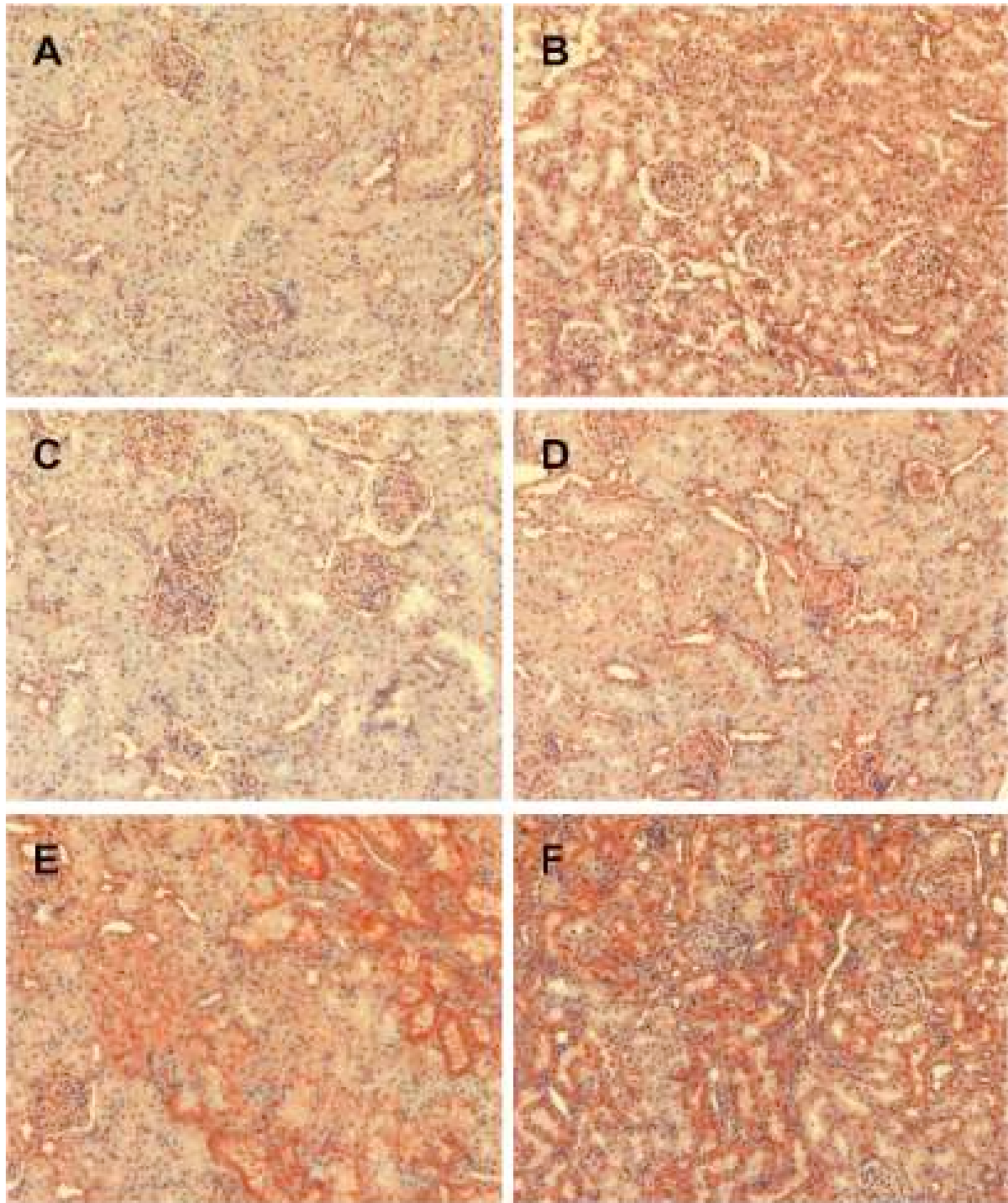


Abb.20:

Vorkommen der Cytochrom P (CYP) 450-Isoformen 2B1 (A, B), 2E1 (C, D) und 4A1 (E, F)(braune Färbung) in Nieren junger männlicher Ratten. Kontrolltiere (A, C, E) wurden in vier Zyklen mit physiologischer Kochsalzlösung behandelt, die Tiere der IFO-Gruppe (B, D, F) erhielten 6mg IFO/100g KG. Immunperoxidase-Färbung; Gegenfärbung mit Hämatoxylin; 100-fache Vergrößerung.

Ergebnisse

Tabelle 2:

Semiquantitative Bewertung der Immunperoxidase-Färbung für CYP 1A1, 2B1, 2E1, 3A2 und 4A1 in Lebern der mit 0,9% NaCl behandelten Kontrolltiere (Ko) sowie der mit 6mg IFO/100g KG behandelten Versuchstiere (IFO). Hepatozyten aus dem periportal (PP), intermediären (IM) und perivenösen (PV) Bereich sowie dem Gallengangepithel des Leberacinus wurden auf Vorkommen (- kein; + selten; ++ häufig; +++ sehr häufig) und Anfärbbarkeit (- keine; + geringe; ++ moderate; +++ starke) bewertet.

CYP-Isoform	Zellart	Ko		IFO	
		Vorkommen	Färbung	Vorkommen	Färbung
1A1	Hepatozyten PP	+++	+	+/++	-/+
	Hepatozyten IM	+++	+	+/++	-/+
	Hepatozyten PV	+++	+	+	+
	Gallengangepithel	++	+	++	+
2B1	Hepatozyten PP	++/+++	+	-	-
	Hepatozyten IM	+++	+/++	-/+	+
	Hepatozyten PV	+++	++	+++	+
	Gallengangepithel	++	+	++	+
2E1	Hepatozyten PP	+++	+	+++	+
	Hepatozyten IM	+++	+/++	+++	++
	Hepatozyten PV	+++	++	+++	++/+++
	Gallengangepithel	++	+	++	+
3A2	Hepatozyten PP	+++	+	-	-
	Hepatozyten IM	+++	+/++	-	-
	Hepatozyten PV	+++	++	+	+
	Gallengangepithel	++	+	++	+
4A1	Hepatozyten PP	+++	+/++	+++	++
	Hepatozyten IM	+++	+/++	+++	++
	Hepatozyten PV	+++	++	+++	++/+++
	Gallengangepithel	++	+	++	+

Ergebnisse

Tabelle 3:

Semiquantitative Bewertung der Immunperoxidase-Färbung für CYP 1A1, 2B1, 2E1, 3A2 und 4A1 in Nieren der mit 0,9% NaCl behandelten Kontrolltiere (Ko) sowie der mit 6mg IFO/100g KG behandelten Versuchstiere (IFO). Epithelzellen aus Glomerula, proximalem Tubulus, distalem Tubulus, Sammelrohr sowie Endothelzellen der Gefäße wurden auf Vorkommen (- kein; + selten; ++ häufig; +++ sehr häufig) und Anfärbbarkeit (- keine; + geringe; ++ moderate; +++ starke) bewertet.

CYP-Isoform	Zellart	Ko		IFO	
		Vorkommen	Färbung	Vorkommen	Färbung
1A1	Glomerulus	+++	+	+++	-/+
	Proximaler Tubulus	+++	-/+	+++	+
	Distaler Tubulus	+++	+ /+++	+++	++
	Sammelrohr	+++	+	+++	++
	Gefäße	+	+	+	+
2B1	Glomerulus	+++	-/+	+++	+
	Proximaler Tubulus	+++	-/+	+++	++
	Distaler Tubulus	+++	+ /+++	+++	++ /+++
	Sammelrohr	+++	+ /+++	+++	++ /+++
	Gefäße	+	+	+	+
2E1	Glomerulus	+++	-/+	+++	+ /+++
	Proximaler Tubulus	+++	-/+	+++	+
	Distaler Tubulus	+++	+	+++	++ /+++
	Sammelrohr	+++	+	+++	++
	Gefäße	+	+	++	+
3A2	Glomerulus	+++	-/+	+++	+
	Proximaler Tubulus	+++	-/+	+++	+
	Distaler Tubulus	+++	+ /+++	+++	++
	Sammelrohr	+++	+ /+++	+++	++
	Gefäße	+	+	+	+
4A1	Glomerulus	+++	+	+++	-/+
	Proximaler Tubulus	+++	+ /+++ /+++	+++	++ /+++
	Distaler Tubulus	+++	+ /+++ /+++	+++	++ /+++
	Sammelrohr	+++	+ /+++ /+++	+++	++ /+++
	Gefäß	+	+	+	+

Ergebnisse

Abschließend sei noch ein bemerkenswerter Befund erwähnt, der für die Interpretation der vorliegenden Arbeit von Bedeutung ist. Abbildung 21 zeigt beispielhaft bei einem Versuchstier der IFO-Gruppe (Abb. 21B) ein starkes Längenwachstum der Nagezähne. Dieses Phänomen trat in unterschiedlicher Ausprägung bei allen Tieren der IFO-Gruppen auf.



Abb.21:

Längen der Nagezähne bei männlichen Jungtieren 14 Wochen nach Behandlungsbeginn mit 0,9% NaCl-Lösung (A) bzw. mit 6mg IFO/100g KG (B) in vier Zyklen mit einem Abstand von zwei Wochen.

5. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde anhand von drei verschiedenen Versuchsanordnungen die Ifosfamid (IFO)-induzierte Nephropathie am Tiermodell der Ratte untersucht. Die Versuche unterschieden sich bezüglich Alter und Geschlecht der Versuchstiere, der Dosierung von IFO sowie der Länge des Behandlungs- und Beobachtungszeitraumes. Ziel dieser Arbeit war es, anhand von verschiedenen Parametern (Körpergewichtsentwicklung, Harnvolumen, Ausscheidung von Gesamtprotein, Albumin, Natrium, Kalium, Phosphat und Glukose in den Harn, Biotransformation, morphologische Untersuchungen) die Entstehung eines Fanconi-Syndroms bei der Ratte nachzuweisen.

Das FS wird als generalisierte Störung der renal tubulären Reabsorption ohne primär glomeruläre Schädigung definiert (Patzner 2003). Es ist durch eine Polyurie, den renalen Verlust von Bikarbonat, Phosphat, Glukose, Aminosäuren, Natrium, Kalium, Kalzium und „low-molecular-weight“-Proteinen sowie durch eine Abnahme des protektiv wirkenden Glutathion in der Tubuluszelle gekennzeichnet (Mimić-Oka und Simić 1997, Patzner 2003, Sener et al. 2004). Klinische Symptome sind bei Kindern Minderwuchs, Azidose und vitaminresistente Rachitis sowie bei erwachsenen Patienten Osteoporose und Osteomalazie. Das komplette FS ist irreversibel. Es kann vom inkompletten FS bei Auftreten aller durch IFO ausgelösten Merkmale unterschieden werden und wird in der Klinik bei 1,5-5% aller mit IFO behandelten Kinder diagnostiziert (Loebstein et al. 1999, Rossi et al. 1999, Patzner et al. 2001, Aleksa et al. 2004a). Häufiger sind jedoch subklinische proximal-tubuläre Funktionsstörungen der Niere, welche bei 20-30% aller mit IFO behandelten Patienten auftreten (Skinner et al. 1993, English et al. 1997). Die Entstehung eines FS kann in engem zeitlichen Zusammenhang mit der IFO-Applikation (Heney et al. 1989), aber auch Jahre nach Therapieende beobachtet werden (Moncrieff und Foot 1989, Negro et al. 1998, Rossi et al. 1999, Skinner 2003).

Zunächst führten wir einen Versuch analog zu Literaturdaten (Springate und Van Liew 1995) durch, um akute Effekte einer IFO-Behandlung nachzuweisen. Anfänglich erfolgsversprechenden Ergebnissen in Form erhöhter renaler Ausscheidungen von Protein, Phosphat und Elektrolyten schloss sich allerdings eine Phase der verringerten Ausscheidung dieser Harnbestandteile an. Somit konnte während der gesamten Beobachtungsdauer der ersten Versuchsreihe eine akute Nieren-

dysfunktion weder aufrechterhalten noch in eine chronische Form im Sinne eines FS überführt werden. Der darauffolgende Versuch sollte die Situation in der Pädiatrie reproduzieren, indem junge Versuchstiere auf Langzeiteffekte einer IFO-Behandlung untersucht wurden. Dazu wurden die Harnparameter monatlich nach Abschluss einer mehrfachen IFO-Gabe nach Hinweisen auf ein FS überprüft. Auch in dieser Versuchsreihe wurden weibliche Ratten verwendet, was Geschlechtsunterschiede ausschalten und einen besseren Vergleich der Versuchsreihen 1 und 2 ermöglichen sollte. Hierbei wurden subakute Effekte erfasst; ein FS trat jedoch nicht auf. Die Versuche wurden mit jungen männlichen Tieren fortgesetzt, da die höhere Biotransformationsrate bei Männchen das Entstehen größerer Mengen an FS-auslösenden Metaboliten des IFO versprach. Es wurde nur ein Diureseversuch durchgeführt, da die Letalität sehr hoch war. Auch hier konnte die Synopsis der Ergebnisse nicht auf die Entstehung eines FS schließen lassen. Vielmehr wiesen die Körpergewichtsentwicklung, die Harnparameter, die Veränderung der Biotransformationskapazität und die morphologische Untersuchung von Lebern und Nieren sowie die hohe Sterblichkeit der Versuchstiere auf eine Hungerdystrophie hin. Für Ratten wurde als LD₅₀ die einmalige Gabe von 40 mg IFO/100g KG ermittelt (Germann et al. 2005). Dies ist deutlich höher als die in unserer Arbeit verwendete Dosis. Allerdings liegen Dosierungen von 6-8mg IFO/100g KG, wie in unseren Versuchen verwendet, im Bereich der chronisch toxischen Dosis (Germann et al. 2005). Am Menschen werden meist Dosen von 5-6 mg IFO/100g KG appliziert. Germann et al. (2005) verabreichten in ihren Versuchen Ratten den Metaboliten IFO-Mustard intravenös. Dadurch ist es problematisch, diese Ergebnisse mit unseren Versuchen an IFO-behandelten Tieren zu vergleichen. IFO-Mustard ist durch ein niedrigeres Molekulargewicht sowie durch eine größere Toxizität als IFO gekennzeichnet. Seine zellschädigende Wirkung besteht in der Alkylierung von DNS, worauf es zu „crosslinks“ und damit zu irreversiblen Schäden im Erbgut der Zelle kommt (Dong et al. 1995, Kerbusch et al. 2001).

5.1. Tiermodelle zur Erzeugung eines Fanconi-Syndroms

Springate und Van Liew (1995) berichteten, das IFO-induzierte akute FS am Tiermodell der Ratte hervorgerufen zu haben. Sie applizierten in vier Behandlungszyklen (einmal täglich an drei aufeinander folgenden Tagen mit einem

Abstand von drei Wochen) entweder 4 oder 8mg IFO/100g KG i.p.. Diureseversuche wurden einen Tag nach der IFO-Gabe durchgeführt. Versuchstiere, welche mit 4mg IFO/100g KG behandelt wurden, entwickelten nach dem 4. Behandlungszyklus eine Phosphaturie. Nach Applikation von 8mg IFO/100g KG trat eine geringgradige Glukosurie sowie Phosphaturie und Proteinurie auf. Beide IFO-Gruppen wiesen geringere Hämatokritwerte und einen geringeren Zuwachs an Körpergewicht im Vergleich zu Kontrolltieren auf. Springate und Van Liew beendeten ihre Beobachtung nach dem 4. Behandlungszyklus und wiesen somit eine Fanconi-ähnliche Nierenfunktionsstörung als Ausdruck der akuten nephrotoxischen Wirkung von IFO nach. Die von uns in ähnlicher Anordnung durchgeführte Versuchsreihe 1 an erwachsenen weiblichen Ratten erbrachte abweichende Resultate. In vier Behandlungszyklen in einem Abstand von drei Wochen wurde erwachsenen weiblichen Ratten an drei aufeinanderfolgenden Tagen je 8mg IFO/100g KG i.p. injiziert. Diureseversuche fanden zwei Tage nach jedem Behandlungszyklus statt. Nach dem ersten Behandlungszyklus wurden Symptome einer akuten Nierenfunktionsstörung gefunden (Polyurie, erhöhte renale Ausscheidung von Protein, Albumin, Natrium, Kalium und Glukose). Ein temporärer renaler Phosphatverlust als Leitsymptom des FS wurde ebenfalls festgestellt. Diese Resultate stehen zunächst in Einklang mit Ergebnissen, welche in der Literatur (s.o.) beschrieben wurden: Springate und Van Liew (1995) erhielten in der erwähnten Studie ähnliche Ergebnisse (Glukosurie, Phosphaturie, Proteinurie), allerdings erst am Ende ihrer Untersuchungen. Nissim und Weinberg (1996) sowie Badary (1999a und 1999b) untersuchten die Wirkung von 5 mg IFO/100g KG (einmal täglich an fünf aufeinanderfolgenden Tagen) auf männliche Ratten und beobachteten auch einen renalen Verlust von Elektrolyten, Glukose und Aminosäuren.

In unserem Versuch gingen jedoch nach der 2. IFO-Applikation die Natrium- und Kaliumausscheidung und nach der 3. und 4. IFO-Behandlung zusätzlich das Harnvolumen und die renal ausgeschiedene Glukosemenge deutlich zurück und lagen unterhalb des Kontrollbereichs. Diese Ergebnisse korrelierten somit nicht mit den Symptomen eines FS, welche über den Zeitpunkt der IFO-Behandlung hinaus erhöhte Harnvolumina und eine vermehrte Ausscheidung von Elektrolyten, Phosphat und energiereicher Substrate wie Glukose und Proteine aufzeigen. Es konnten somit keine Fanconi-ähnlichen Nierenfunktionsstörungen mit diesem Versuchsansatz hervorgerufen werden. Vielmehr wiesen die Ergebnisse der 1. Versuchsreihe auf

eine akute renale Dysfunktion durch die IFO-Gabe hin. Sener et al. (2004) stellten einen Zusammenhang zwischen einer akuten IFO-induzierten Nephropathie und reduzierter Na^+/K^+ -ATPase-Aktivität sowie dem Verbrauch von intrazellulärem Glutathion (GSH) in den Tubuluszellen der Niere her. Sauerstoffradikale mit zytotoxischer Wirkung werden beim Gesunden durch GSH abgefangen und unschädlich gemacht. 4-Hydroxy-Ifosfamid, der aktive Metabolit und nicht IFO selbst, reduziert den intrazellulären GSH-Spiegel und verhindert somit dessen zellprotektive Wirkung (Kuppner et al. 2003).

5.2. Altersabhängigkeit der Nephrotoxizität von IFO

Loebstein und Mitarbeiter wiesen 1999 in einer Studie mit 192 Kindern und Jugendlichen im Alter zwischen 0,4-21 (\bar{x} 8,7) Jahren nach, dass ein Alter von weniger als 5 Jahren ein erhöhtes Risiko darstellt, an einem FS zu erkranken. Auf Grund dessen wurde die IFO-Wirkung in der 2. Versuchsreihe an jungen weiblichen und in der 3. an jungen männlichen Ratten untersucht. Als zwingende Voraussetzung, um ein FS bzw. FS-artige Symptome auszulösen, ist die wiederholte IFO-Applikation erforderlich. Mit steigender Menge des verabreichten IFO steigt auch das Risiko, an einem FS zu erkranken (Pratt et al. 1991, Skinner et al. 1993, Loebstein et al. 1999). Daher wurden die Behandlungsabstände auf zwei Wochen verkürzt, und die Versuchsanordnung der 2. Untersuchungsreihe wurde auf insgesamt fünf Behandlungszyklen erweitert. Da es zudem unser Ziel war, ein Tiermodell für die chronische Wirkung von IFO auf die Nierenfunktion zu entwickeln, wurde zusätzlich der Beobachtungszeitraum bei den jungen Weibchen auf 27 Wochen und bei den Männchen auf 14 Wochen verlängert. Diureseversuche (D_1 – D_5) zur Bestimmung der Harnparameter wurden in der 2. Versuchsreihe monatlich und im 3. Versuch einmal sieben Wochen nach Abschluss der IFO-Applikationen durchgeführt.

Die jungen weiblichen Versuchstiere nahmen im Vergleich zu den Kontrolltieren signifikant langsamer an Gewicht zu. Sie zeichneten sich jedoch durch eine hohe Adaptationsfähigkeit aus und verloren nach Beendigung der IFO-Applikation nur vorübergehend an Gewicht. Danach nahmen sie bis zum Versuchsende stetig zu. Eines der 40 Versuchstiere verstarb nach dem 4. Behandlungszyklus, fünf weitere im Beobachtungszeitraum nach der letzten IFO-Applikation. Eine Oligurie wurde nur drei

Monate nach der letzten IFO-Gabe (D_3) festgestellt. Sonst war die ausgeschiedene Harnmenge unverändert. Eine Proteinurie wurde direkt nach dem letzten Behandlungszyklus beobachtet, konnte aber zu späteren Zeitpunkten nicht mehr gefunden werden. Alle übrigen Parameter befanden sich im Kontrollbereich. Es kam jedoch sowohl in der Kontroll- als auch in der IFO-Gruppe zu parallelen Schwankungen insbesondere der Phosphat- und der Glukoseausscheidung, deren Ursache im Rahmen unserer Untersuchungen nicht geklärt werden konnte. Eine erhöhte Ausscheidung von Glukose einen Monat nach der letzten IFO-Gabe (D_1) bzw. eine verringerte Ausscheidung von Phosphat am Ende des Beobachtungszeitraumes (D_5) wurde in beiden Gruppen festgestellt. Da die IFO-Applikationen und die darauffolgenden Diureseversuche in der Wachstumsphase der Versuchstiere durchgeführt wurden, ist die Wahrscheinlichkeit groß, dass Glukose bzw. Phosphat vermehrt verstoffwechselt worden sind. Eine positive Phosphatbilanz, bei welcher die Phosphataufnahme die renale und intestinale Ausscheidung übersteigt, wird bei allen im Wachstum befindlichen Organismen beobachtet und steht möglicherweise im Zusammenhang mit der Knochenmineralisation. Auch der Bedarf an Glukose als Energieträger ist in der Phase des Wachstums erhöht (Ulmer 2000). Fasst man die Befunde der 2. Versuchsanordnung zusammen, konnte auch hier trotz relativ langer Beobachtungszeit kein Fanconi-Syndrom nachgewiesen werden. Sowohl die Altersunterschiede als auch die verschiedenen Versuchsanordnungen waren für die unterschiedlichen Ergebnisse in den Untersuchungsgruppen 1 und 2 verantwortlich. Durch die zeitliche Verzögerung von einem Monat zwischen der letzten IFO-Gabe und dem Beginn der Diureseversuche konnten im 2. Versuch akute Nierenschäden ausgeschlossen werden. Die IFO-Toxizität auf weibliche Jungtiere zeigte sich bei gleicher Dosierung lediglich in einer relativ geringeren Letalität sowie nur in wenigen Unterschieden der Harnparameter zwischen IFO- und Kontrollgruppe. Das schnell erfolgende Angleichen der Körpergewichte der IFO-Tiere an die Kontrollgruppe nach Beendigung der IFO-Applikation spricht für eine hohe Regenerationsbereitschaft, so dass die in der 2. Versuchsanordnung gemessenen Effekte als subakut einzustufen sind.

Die Ergebnisse des 3. Versuches mit männlichen Jungtieren unterschieden sich deutlich von denen der weiblichen. Der Zuwachs an Körpergewicht sistierte nach dem dritten der vier Behandlungszyklen. 14 Tiere verstarben in der neunten Woche, weitere 15 bis zum Ende des Versuches. Im Diureseversuch sieben Wochen nach

dem letzten Behandlungszyklus wurde gezeigt, dass es bei den überlebenden IFO-Tieren zu einer Oligurie kam. Damit einher ging eine erhöhte tubuläre Rücknahme von Elektrolyten sowie Glukose und Protein. Hierbei sind deutliche Parallelen zur Versuchsreihe 1 erkennbar. Ebenso wie bei den erwachsenen weiblichen Tieren war das Harnvolumen sowie die Natrium-, Kalium- und Glukoseausscheidung bei den männlichen Jungtieren sieben Wochen nach Abschluss der IFO-Gabe verringert. Beim Vergleich von Versuchsreihe 2 und 3 zeigte sich, dass trotz herabgesetzter Dosis von 6mg/100g KG die Letalität bei männlichen Versuchstieren deutlich höher war. Ein schlechter Allgemeinzustand, gekennzeichnet durch einen erheblichen Gewichtsverlust, ist wahrscheinlich auf die Geschlechtsunterschiede bei der Giftung von IFO zurückzuführen. Die beim 3. Versuch beobachtete verringerte Kreatininclearance zeigte, dass bei jungen männlichen Versuchstieren neben der tubulären zusätzlich eine glomeruläre Beeinträchtigung mit herabgesetzter GFR bestand. Dies ist ein weiterer Unterschied zwischen männlichen und weiblichen Ratten, bei welchen kein Unterschied der GFR festgestellt wurde. Auch Badary (1999a) beschreibt einen erhöhten Serumkreatininspiegel nach IFO-Behandlung seiner männlichen Versuchstiere. Wie bereits oben erwähnt ergab die Harnanalyse im 3. Versuch keinen Hinweis auf die Entstehung eines FS. Die verringerte Ausscheidung von Elektrolyten und energiereichen Substraten (Glukose, Proteine), welche bei den jungen männlichen Ratten unserer 3. Versuchsreihe beobachtet wurde, war unerwartet. Das Gegenteil, nämlich eine exzessive Ausscheidung von Elektrolyten, Phosphat, Glukose und Protein wären typisch für ein FS.

5.3. Auswirkung von IFO auf die Biotransformation der Ratte

Laut Mohrmann et al. (1994) sind IFO-Metabolite und nicht IFO selbst für die nephrotoxische Wirkung verantwortlich. IFO wird auf verschiedenen Wegen in Leber und Niere aktiviert bzw. deaktiviert. Die wichtigsten aktiven Metabolite entstehen entweder durch Dechloroacetylierung (2- bzw. 3-Dechloroethylifosfamid und Chloracetaldehyd (CAA)) oder durch Umwandlung zu 4-Hydroxy-IFO (4-OH-IFO) und weiter zu IFO-Mustard und Acrolein. Dies wird beim Menschen durch die CYP-Isoformen 3A4 und 2B6 vermittelt. Die menschliche Isoform CYP 2B6 entspricht dem CYP 2B1 der Ratte. Entsprechend der Isoform CYP 3A4 beim Menschen existiert bei Ratten CYP 3A1 bzw. 3A2 (Kerbusch et al. 2001). Dubourg et al. (2002) führten

Versuche an Tubuluszellen mit CAA in vitro durch. CAA induziert einen intrazellulären ATP-Abfall sowie eine reduzierte Laktataufnahme der Tubuluszelle. Außerdem wird weniger Laktat zu Glukose umgewandelt. Dubourg et al. (2002) konnten keinen Unterschied in der Toxizität von CAA an Tubuluszellen jugendlicher und adulter Tiere beobachten. CAA ist somit nicht die Ursache für die an den jungen männlichen Ratten beobachtete erhöhte Letalität. Allerdings besitzen Acrolein und 4-Hydroxy-IFO eine weitaus höhere Toxizität als IFO selbst (Mohrmann et al. 1994). Für diesen Unterschied lässt sich eine deutliche Altersabhängigkeit nachweisen, wobei junge Individuen wesentlich empfindlicher reagieren (Furlanut und Franceschi 2003).

Laut Klinger (1998) metabolisieren männliche Versuchstiere Medikamente effektiver als weibliche. Die Annahme, dass größere Mengen von toxischen Metaboliten entstehen, lässt darauf schließen, dass männliche Ratten auf IFO empfindlicher reagieren könnten als weibliche. Aus diesem Grund untersuchten wir in dem 3. Versuch männliche Jungtiere, wobei sich zeigte, dass sie die geringere Dosierung von 6mg IFO/100g KG schlechter vertrugen. Wie bereits oben erwähnt konnte auch für diesen Versuchsaufbau das FS nicht nachgewiesen werden. Allerdings lassen die Untersuchungen des Gehaltes und der Aktivität von Cytochrom P450 und dessen Untergruppen auf andere IFO-induzierte Reaktionen schließen, worauf im Kapitel 5.4.4. genauer eingegangen wird.

5.4. IFO-induzierte Hungerdystrophie

Die dargestellten Befunde der Versuchsreihen 1-3 führen zu der Schlussfolgerung, dass unter den gewählten Bedingungen an der Ratte kein FS auslösbar ist. Ursachen dafür sind einerseits das seltene Auftreten (ca. 5% beim Menschen) andererseits die bekannte Unempfindlichkeit von Ratten gegenüber vielen Medikamenten (Dixit und Boelsterli 2007). Es ist erwiesen, dass Ratten über eine höhere Biotransformationskapazität verfügen, was der Entstehung eines FS entgegenwirken könnte, auch wenn unter 5.3. die Bedeutung der Biotransformation für die Giftung von IFO in die Betrachtung einbezogen worden ist. Dennoch lassen signifikante Unterschiede zwischen den IFO-Tieren und den Kontrollen auf IFO-bedingte Schädigungen schließen, die man in ihrer Summe als Folge einer

Hungerdystrophie bezeichnen kann und die im folgenden näher dargestellt werden sollen.

5.4.1. Körper- und Organgewichte

In den drei IFO-Gruppen entwickelte sich das Körpergewicht signifikant langsamer als bei Kontrollen. Adulte weibliche und junge männliche IFO-Tiere verloren ab der dritten IFO-Applikation deutlich an Körpergewicht. Diese beiden Versuchsgruppen wiesen auch die höchste Letalität auf. In der 1. Versuchsreihe starben 12 Tiere, weitere 29 in der 3. Versuchsreihe. In verschiedenen Arbeiten wurde an Ratten nach IFO-Applikation Gewichtsverlust beschrieben (Springate and Van Liew 1995, Badary 1999b).

Allgemein resultiert verringerte Nahrungsaufnahme, Malabsorption oder Maldigestion in einer Gewichtsabnahme bis hin zur Kachexie, welche sehr häufig bei zytostatisch behandelten Patienten beobachtet wird. Häufig ist die gegen den Tumor eingeleitete Behandlung für eine Anorexie verantwortlich (Argiles et al. 2006). Die Tiere in unseren Versuchen schienen aufgrund ihres schlechten Allgemeinzustandes die Nahrung zu verweigern. Trotz Fütterung der IFO-Tiere ad libitum verlangsamte sich die Gewichtsentwicklung bis hin zur Gewichtsabnahme. Der sich daraus ergebende Hungerzustand zehrte die IFO-Tiere zum Teil bis zum Hungertod aus. Ein Beleg der Nahrungskarenz liefert die Abb. 21. Nagezähne von Rodontia wachsen ein Leben lang nach, wobei die Wachstumsrate der Nagezähne zwei bis drei Millimeter pro Woche beträgt. Durch das Benagen von hartem Futter und durch den Abrieb an den gegenüberliegenden Zähnen bleiben sie bei einer gewissen Längenkonstanz (Abb.21A). Bei fehlender Abnutzung, beispielsweise durch Nahrungsverweigerung, wachsen die Nagezähne ständig weiter (Abb.21B). Hieraus bildet sich ein Circulus Vitiosus, wobei die zunehmende Zahnlänge die Nahrungsaufnahme zusätzlich erschwert.

Des Weiteren werden Nebenwirkungen wie Übelkeit, Erbrechen, Alopezie, Neutropenie und Thrombozytopenie (Loss et al. 2004) sowie Kardiotoxizität (Arrhythmien, Myokarditis, Perikarditis) und Hypertonie insbesondere bei der Anwendung hoher IFO-Dosen beschrieben (Klastersky 2003). Die Gesamtheit der Beschwerden, welche sich aus der Tumorerkrankung und der dagegen angesetzten Behandlung zusammensetzt, führt meist zu einer rapiden Verschlechterung des

Allgemeinbefindens und kann wiederum zu Appetitlosigkeit, Übelkeit, Depressionen sowie psychosomatischen Beschwerden führen (Khayat 2000).

Jede Verminderung der Nahrungsaufnahme bringt eine Abnahme des Zell- und Organvolumens mit sich. Dabei werden zuerst die Kohlenhydratdepots (wie in Kapitel 5.4.5. Morphologie genauer erläutert) und Fettspeicher, später auch Proteine abgebaut (Gedigk und Totović 1977). Die Organgewichte (Leber und Niere) der überlebenden Versuchstiere des dritten Versuches waren signifikant verringert, was als Beleg für die Malnutrition der IFO-Tiere zu werten ist.

5.4.2. Harnvolumen

In allen drei Versuchen, besonders aber bei den erwachsenen weiblichen sowie den jungen männlichen IFO-Tieren, wurden gegenüber Kontrollen geringere Harnvolumina ausgeschieden. Thompson et al. (1987) sowie Wilke et al. (2005) beobachteten, dass hungernde Tiere weniger Wasser aufnahmen. Trotzdem schieden sie zunächst vermehrt Harn aus. Daran schloss sich eine oligurische Phase, die bis zum Ende der Fastenperiode anhielt.

Ein an der Wasserresorption beteiligtes Glykoprotein in den Hauptzellen des Sammelrohres ist Aquaporin 2 (Lang und Fromm 2000). Untersuchungen von Wilke et al. (2005) ergaben, dass es in den ersten 24 Stunden des Fastens signifikant verringert, jedoch nach 72 Stunden verstärkt exprimiert wurde. Die ADH-Expression blieb in diesem Versuch unverändert, was auf einen ADH-unabhängigen Mechanismus hinweist. Diese Ergebnisse korrelierten insbesondere mit den Harnbefunden der erwachsenen weibliche Ratten aus der 1. Versuchsreihe: einer polyurischen Phase nach der ersten IFO-Applikation folgte die Ausscheidung geringerer Harnmengen (3. und 4. IFO-Applikation). Aber auch die jungen weiblichen und jungen männlichen Tiere schieden drei Monate bzw. sieben Wochen nach der letzten IFO-Gabe signifikant geringere Harnmengen als die Kontrolltiere aus.

5.4.3. Harninhaltsstoffe

Weitere Anhaltspunkte für eine IFO-induzierte Kachexie bot die Betrachtung der renalen Ausscheidung von energiereichen Substraten (Glukose, Proteine) und Elektrolyten. Die IFO-Tiere der 1. und 2. Versuchsreihe schieden zunächst vermehrt

Gesamtprotein im Harn aus, glichen sich aber im Verlauf des Versuches den Kontrollen an. Die Glukoseausscheidung, welche sich bei den adulten weiblichen Ratten zunächst im Kontrollbereich befand, verringerte sich nach dem 3. und 4. Behandlungszyklus signifikant. Die überlebenden jungen männlichen Ratten der 3. Versuchsreihe schieden sieben Wochen nach der letzten IFO-Gabe weniger Protein und Glukose im Harn aus. D.h. im Falle der erwachsenen weiblichen Tiere wurde Glukose und bei den jungen männlichen Ratten zusätzlich Gesamtprotein verstärkt zurückgehalten. Somit gingen energiereiche Substrate dem Körper über die Harnwege nicht verloren und standen den Tieren weiterhin zur Verfügung.

Ähnliche Resultate erhielten wir bezüglich der renalen Ausscheidung von Elektrolyten. Während sich die Elektrolytausscheidung im Harn der jungen weiblichen IFO-Tiere im gesamten Beobachtungszeitraum im Kontrollbereich befand, gab es bei den erwachsenen weiblichen und jungen männlichen Tieren signifikante Unterschiede zu den Kontrolltieren. Die IFO-Ratten der 1. Versuchsreihe schieden nach der ersten IFO-Gabe vermehrt Elektrolyte im Harn aus. In den Behandlungszyklen zwei, drei und vier kam es jedoch zu einer geringeren Ausscheidung im Harn. In der 3. Versuchsreihe wurde außerdem eine verringerte Kreatininclearance festgestellt, so dass auch die Filtration von Natrium und Kalium vermindert war, und damit der Organismus vor dem Verlust dieser Solute bewahrt wurde. Vermutlich können Kachexie und die gestörte Entwicklung der Versuchstiere auf IFO-induzierte systemische Effekte zurückgeführt werden. Ein ähnliches Verhalten im Rahmen der Anpassung des Nährstoffhaushaltes wurde für hungernde Ratten beschrieben. Steele (1982) beobachtete an sieben Tage fastenden Ratten eine verstärkte Phosphatrücknahme. Weitere Untersuchungen ergaben einen verringerten renalen Plasmafluss sowie eine abnehmende GFR (Boim et al. 1992).

5.4.4. Biotransformation

Shi et al. (2001) berichteten, dass bei Ratten eine akute Leberschädigung durch IFO mit einem verringerten CYP-Gehalt im Lebergewebe einherging. Wir untersuchten neben dem CYP-Gehalt auch die Monooxygenaseaktivität der CYP-Isoformen 1A1, 2B1, 2E1, 3A2 und 4A1 an jungen männlichen Ratten. Unsere Untersuchungen ergaben keinen Unterschied im CYP-Gehalt von Nieren- bzw. Lebergewebe zwischen Kontrolltieren und IFO-behandelten Versuchstieren. Allerdings war die

Enzymaktivität aller in der Leber untersuchten CYP-Isoformen mit Ausnahme von CYP 2E1 signifikant verringert, was durch den verringerten Stoffumsatz in den Modellreaktionen ECOD, EROD, PROD, EMND und 2 β -TH sowie den erhöhten Metabolismus von PNPB nachgewiesen werden konnte. Im Nierengewebe kam es hingegen zu einem signifikanten Anstieg der Aktivität aller Modellreaktionen. Das stützt die Annahme einer IFO-bedingten Hungerdystrophie, da eine verstärkte CYP 2E1-Aktivität bei gleichzeitiger Verringerung der CYP 1A1-, 2B1-, 3A2- und 4A1-Aktivität in der Leber auf anhaltenden Hunger schließen lässt. Unsere Resultate stimmen mit den Ergebnissen von Kachula und Pentiuk (2004) überein, welche nach Fasten die akuten Reaktionen an verschiedenen Organen (Leber, Niere, Lunge) von Ratten untersuchten. Auch sie fanden eine erhöhte CYP 2E1-Aktivität in allen untersuchten Organen sowie eine verringerte Aktivität der CYP-Isoformen 2D, 1A2 und 2C in der Leber. Ronis und Mitarbeiter (1998) kamen zu ähnlichen Ergebnissen, indem sie Ratten fasten ließen und damit einen Anstieg der CYP 2E1-, 2B- und 3A-Aktivität in der Niere bewirkten. Des Weiteren korrelieren unsere Ergebnisse mit anderen Studien, worin von einem Anstieg der CYP 2E1-Aktivität in Leber- und Nierengewebe von fastenden Ratten berichtet wird (Liu et al. 1993). Reen et al. (1999) beobachteten nach einer Hungerperiode an männlichen Versuchstieren ebenfalls einen deutlichen Anstieg sowohl des Gesamt-CYP-Gehaltes in der Leber als auch der Monooxygenase-Aktivität in Leber und Niere. Eine Kachexie wurde in diesen Versuchen durch eine 40%ige Nahrungseinschränkung, beginnend während der Trächtigkeit der Muttertiere bis zu einem Alter der Versuchstiere von 90 Tagen, ausgelöst. Die CYP 2E-Aktivität war in dieser Studie von allen untersuchten CYP-Isoformen am deutlichsten erhöht. Dies stimmt mit unseren Ergebnissen überein und verdeutlicht, dass Körpergewichtsverlust und erhöhte Letalität sehr wahrscheinlich durch eine IFO-induzierte Kachexie verursacht wurden.

5.4.5. Morphologie

In der oben erwähnten Studie beschrieben Shi und Mitarbeiter (2001) eine Vakuolisierung sowie punkt- bis herdförmige Nekrosen von Leberzellverbänden im perivenösen Bereich der Leberläppchen. Außerdem zeigte sich eine vermehrte Anhäufung von Entzündungszellen im Periportalgebiet.

In den Lebern unserer männlichen Jungtiere konnte histologisch ein Verlust des Glykogengehaltes nach IFO-Behandlung, jedoch kein Hinweis auf Leberzellschädigung oder -nekrose gefunden werden. Ein Hungerzustand betrifft zuerst die Energiereserven. Dazu werden das Glykogen und die Fettsubstanzen aus dem Lebergewebe mobilisiert (Eder 1977), wodurch sich die Größe und das Gewicht der Leber verringert. In unseren Versuchen wurden ein Glykogenverlust im Lebergewebe sowie geringere Organgewichte der IFO-Tiere gegenüber Kontrollen gefunden. Der Organismus der Versuchstiere griff aufgrund der Malnutrition auf körpereigene Reserven zurück und nutzte Glykogen zur Erhaltung vitaler Funktionen.

Parallel zur Untersuchung der CYP-Aktivität (s. Kap. 5.4.4.) wurde eine immunhistologische Färbung zur Bestimmung der Expression von CYP-Isoformen durchgeführt. Sie lieferte weitere Belege für den IFO-induzierten Hungereffekt, da hierbei die Ergebnisse der Biotransformationsreaktionen bestätigt werden konnten. Kontrollratten wiesen in den perivenösen Gebieten der Leberläppchen eine geringe Expression von CYP 1A1, jedoch eine deutliche Immunfärbung für die CYP-Isoformen 2B1, 2E1, 3A2 und 4A1 in den zentrolobulären Hepatozyten auf, was mit Beschreibungen anderer Autoren übereinstimmt (Lupp et al. 1998, Oinonen und Lindros 1998). Ein deutlicher Anstieg der CYP 2E1-Färbung wurde bei den Lebern der IFO-Tiere speziell in den perivenösen und intermediären Bereichen gefunden. Eine geringe Anfärbbarkeit der CYP-Isoformen 1A1, 2B1 und 3A2 ergänzen diesen Befund, was sich in Einklang mit den in der vorliegenden Arbeit gemessenen Aktivitäten (s. Kap. 5.4.4.) und auch mit Ergebnissen anderer Studien befindet (Reen et al. 1999, Kachula und Pentiuk 2004). Auch in der Niere bestätigt die Veränderung der Enzymexpression die Annahme, dass es sich bei den Befunden um Hungerreaktionen handelte. Eine intensivere Immunperoxidase-Färbung von CYP 1A1, 2B1, 2E1 und 3A2 im proximalen und distalen Tubulus sowie im Sammelrohr und von CYP 2B1, 2E1 und 3A2 zusätzlich in den Glomerula weist auf eine höhere Enzymaktivität in diesen Bereichen hin. Dies stimmt auch mit unseren Messergebnissen der Modellreaktionen (s. Kap. 5.4.4.) überein und wurde bereits häufig im Zusammenhang mit anhaltendem Fasten beschrieben (Liu et al. 1993, Ronis et al. 1998, Reen et al. 1999, Kachula und Pentiuk 2004). Die Übereinstimmung von Enzymexpression und Enzymaktivität sowohl in den Lebern als auch in den Nieren der IFO-Tiere unterstützt die Annahme, dass es sich bei den vorliegenden Veränderungen um eine Hungerdystrophie handelte.

5.4.6. Schlussfolgerung

Die Synopsis der vorliegenden Resultate lässt darauf schließen, dass die IFO-Tiere der Versuchsreihen 1-3 in unterschiedlichem Ausmaß an einer IFO-induzierten Mangelernährung litten. Dafür sprechen:

- die Reduktion der Leber-, Nieren- und Körpergewichte,
- eine verminderte renale Ausscheidung von Elektrolyten und energiereichen Substanzen wie Glukose und Proteinen,
- eine veränderte CYP-Expression und -Aktivität, insbesondere eine verstärkte Expression und Aktivität von CYP 2E1 und eine verringerte Expression und Aktivität der CYP-Isoformen 1A1, 2B1, 3A2 und 4A1 in der Leber und ein Anstieg aller CYP-Isoformen in der Niere sowie
- der reduzierte Glykogengehalt in der Leber.

Die Unterschiede bezüglich der IFO-Wirkung in den drei Versuchen lassen sich auf die Altersunterschiede der Versuchstiere zu Beginn der IFO-Applikation sowie auf die Geschlechtsunterschiede zurückführen. Als Ursache für alle von uns gefundenen Veränderungen nach einer IFO-Behandlung kommt die Auslösung einer Hungerdystrophie am ehesten infrage. Die CYP-Expression und -Aktivitäten, welche an den IFO-Tieren festgestellt wurden, ähnelten stark denen von hungernden Tieren. Auch der reduzierte Glykogengehalt der Leber stützt die Hungerhypothese.

6. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit sollte die Auslösung eines Ifosfamid (IFO)-induzierten Fanconi-Syndrom (FS) an der Ratte mit Hilfe von drei verschiedenen Versuchsansätzen untersucht werden. Die Versuchsanordnungen unterschieden sich, wie in der Übersichtsgrafik (Tab.4) gezeigt, in Alter und Geschlecht der Ratten, in der IFO-Dosierung und im Beobachtungszeitraum. Der 1. Versuch wurde an 60 Tage alten weiblichen Ratten durchgeführt. In Anlehnung an die Literatur wurde eine Dosis von 8mg IFO/100g KG in insgesamt vier Behandlungszyklen (einmal täglich an drei aufeinanderfolgenden Tagen) mit einem Abstand von drei Wochen appliziert. Diureseversuche wurden zwei Tage nach jedem Behandlungszyklus durchgeführt. Im 2. Versuch wurden 20 Tage alte weibliche Ratten untersucht, welchen in fünf Behandlungszyklen je 8mg IFO/100g KG im Abstand von zwei Wochen gegeben wurde. Diureseversuche wurden 1, 2, 3, 4 und 5 Monate nach dem letzten Behandlungszyklus durchgeführt. Der 3. Versuch fand an 30 Tage alten männlichen Ratten statt. Je 6mg IFO/100g KG wurde in vier Zyklen im Abstand von zwei Wochen injiziert. Ein Diureseversuch fand sieben Wochen nach der letzten IFO-Gabe statt. Die Auswirkungen von IFO wurden anhand des Körpergewichtes, des Harnvolumens, der Kreatininclearance und der renalen Ausscheidung von Gesamtprotein, Albumin, Natrium, Kalium, Phosphat und Glukose bewertet (Tab.4). Im 3. Versuch wurden Leber und Nieren zur Untersuchung der Biotransformationskapazität und der Morphologie entnommen. Bei keinem der drei Versuche gelang es, typische Symptome eines FS hervorzurufen. Lediglich Anzeichen einer akuten Schädigung der Nierenfunktion ließen sich nachweisen. Zum einen tritt das FS sehr selten auf, andererseits sind Ratten im Vergleich zum Menschen gegenüber Medikamentenwirkung deutlich weniger empfindlich. Betrachtet man die Ergebnisse aller drei Versuche im Zusammenhang, so kommt als Ursache für die IFO-bedingten Veränderungen am ehesten die Auslösung einer Hungerdystrophie infrage. Belege dafür lieferten:

1. die verringerte Gewichtsentwicklung sowohl der Körpermassen (1.-3.Versuch) als auch der Lebern und Nieren (3.Versuch),
2. die Harnausscheidung, welche zunächst erhöht (1.Versuch), aber im Verlauf bzw. nach Beendigung der IFO-Gabe (1. und 3.Versuch) deutlich verringert war,

Zusammenfassung

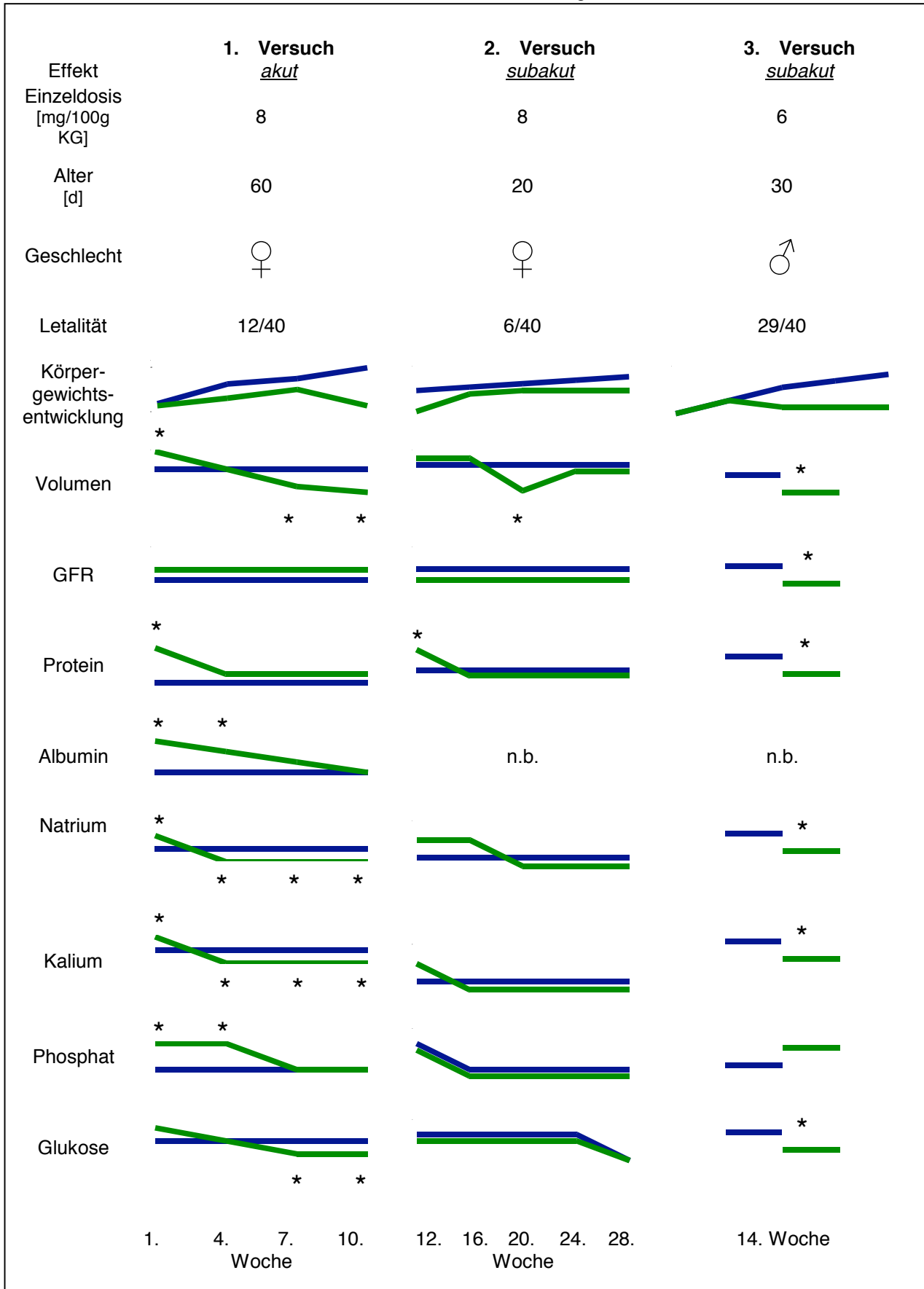
3. eine verminderte Protein- und Glukoseausscheidung,
4. eine geringere Natrium- und Kaliumausscheidung im Verlauf des ersten Versuches sowie sieben Wochen nach der letzten IFO-Gabe des 3. Versuches,
5. eine verringerte Expression und Aktivität aller CYP-Isoformen (außer CYP 2E1) in der Leber sowie eine erhöhte CYP-Expression und Aktivität in der Niere,
6. ein verringerter Glykogengehalt der Leber.

An der Ratte lassen sich akute IFO-Wirkungen auf die Nierenfunktion zweifelsfrei nachweisen. Für die Auslösung chronischer Effekte im Sinne eines FS ist dieses Rattenmodell jedoch nicht geeignet.

Zusammenfassung

Tabelle 4:

Synopsis der Auswirkungen von IFO auf die Nierenfunktion in den verschiedenen Versuchsansätzen dieser Arbeit; — IFO; — Kontrollen; n.b. = nicht bestimmt; * - signifikante Unterschiede zu Kontrollen



7. Literaturverzeichnis

Aitio A (1978):

A simple and sensitive assay of 7-ethoxycoumarin deethylation.

Anal. Biochem. 85: 488 - 491

Aleksa K, Woodland C and Koren G (2001):

Young age and the risk of ifosfamide-induced nephrotoxicity: a critical review of two opposing studies.

Pediatr. Nephrol. 16: 1153 - 1158

Aleksa K, Halachmi N, Ito S und Koren G (2004a):

Renal ontogeny of ifosfamide nephrotoxicity.

J. Lab. Clin. Med. 144: 285 - 293

Aleksa K, Ito S, Koren G (2004b):

Renale-tubule metabolism of ifosfamide to the nephrotoxic chloroacetaldehyde: pharmacokinetic modelling for estimation of intracellular levels.

J. Lab. Clin. Med. 143: 159 - 162

Aleksa K, Matsel D, Krausz K, Gelboin H, Ito, S und Koren G (2005):

Cytochrom P450 3A and 2B6 in the developing kidney: implication for ifosfamide nephrotoxicity.

Pediatr. Nephrol. 20: 872 - 885

Appenroth D und Bräunlich H (1986):

Age-dependent qualitative and quantitative changes in physiological proteinuria in rats.

Z. Versuchstierkd. 28: 77 - 82

Argiles JM, Busquets S, Lopez-Soriano FJ und Figueras M (2006):

Fisiopatologia de la caquexia neoplasica.

Nutr. Hosp. 21 Suppl 3: 4 - 9

Literaturverzeichnis

Badary OA (1998):

Taurine attenuates fanconi syndrome induced by ifosfamide without compromising its antitumor activity.

Oncol. Res. 10: 355 - 360

Badary OA (1999a):

L-Histidinol attenuates Fanconi syndrome induced by ifosfamide in rats.

Exp. Nephrol. 7: 323 - 327

Badary OA (1999b):

Thymiquinone attenuates ifosfamide-induced Fanconi syndrome in rats and enhances its antitumor activity in mice.

J. Ethnopharmacol. 67: 135 - 142

Benesic A, Schwerdt G, Mildenerberger S, Freudinger R, Gordjani N und Gekle M (2005):

Disturbed Ca^{2+} -signaling by chloroacetaldehyde: a possible cause for chronic ifosfamide nephrotoxicity.

Kidney Int. 68: 2029 - 2041

Berrak SG, Pearson M, Berberoglu S, Ilhan IE und Jaffe N (2005):

High-dose ifosfamide in relapsed pediatric osteosarcoma: therapeutic effects and renal toxicity.

Pediatr. Blood Cancer 44: 215 - 219

Boim MA, Ajzen H, Ramos OL und Schor N (1992):

Glomerular hemodynamics and hormonal evaluation during starvation in rats.

Kidney Int. 42: 567 - 572

Brain EG, Yu LJ, Gustafsson K, Drewes P und Waxman DJ (1998):

Modulation of P450-dependent ifosfamide pharmacokinetics: a better understanding of drug activation in vivo.

Br. J. Cancer 77: 1768 – 1776

Literaturverzeichnis

Busse R (2000):

Gefäßsystem und Kreislaufregulation. In: Schmidt RF, Thews G und Lang F (Hrsg.):
Physiologie des Menschen, Springer, Berlin-Heidelberg-New York (2000) S. 498 - 561

Castano E, Marzabal P, Casado FJ, Felipe A und Pastor-Anglada M. (1997):

Na⁺/K⁺-ATPase expression in maleic-acid-induced Fanconi-syndrome in rats.
Clin. Sci. 92: 247 - 253

Chang TK, Crespi CL und Waxman DJ (2006):

Spectrophotometric analysis of human CYP2E1 - catalized p-nitrophenol
hydroxylation.
Meth. Mol. Biol. 320: 127 - 131

Chen L, Waxman DJ, Chen D und Kufe DW (1996):

Sensitization of human breast cancer cells to cyclophosphamide and ifosfamide by
transfer of a liver cytochrome P450 gene.
Cancer Res. 56: 1331 - 1340

Crommentuyn KM, Schellens JH, van den Berg JD und Beijnen JH (1998):

In-vitro metabolism of anti-cancer drugs, methods and applications: paclitaxel,
docetaxel, tamoxifen and ifosfamide.
Cancer Treat. Rev. 24: 345 - 366

Debré R, Marie J, Cleret F und Messimy R (1934):

Rachitisme tardif coexistant avec une nephrite chronique et une glycosurie.
Arch. Med. Enfants 37: 597 - 606

DeToni G (1933):

Remarks on the relations between renal rickets (renal dwarfism) and renal diabetes.
Acta Paediatr. 16: 479 - 484

Literaturverzeichnis

Dixit R und Boelsterli UA (2007):

Healthy animals and animal models of human disease(s) in safety assessment of human pharmaceuticals, including therapeutic antibodies.

Drug Discov. Today 12: 7 - 8

Dong Q, Barsky D, Colvin ME, Melius CF, Ludeman SM, Moravek JF, Colvin OM, Bigner DD, Modrich P und Friedman HS (1995):

A structural basis for a phosphoramidate mustard-induced DNA interstrand cross-link at 5'-d(GAC).

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 12170 - 12174

Dryer RL und Routh JI (1963):

Determination of serum inorganic phosphorus.

Clin. Chem. 4: 191 - 197

Dubourg L, Michoudet C, Cochat P und Baverel G (2001):

Human kidney tubules detoxify chloroacetaldehyde, a presumed nephrotoxic metabolite of ifosfamide.

J. Am. Soc. Nephrol. 12: 1615 - 1623

Dubourg L, Taniere P, Cochat P, Baverel G und Michoudet C (2002):

Toxicity of chloroacetaldehyde is similar in adult and pediatric kidney tubules.

Pediatr. Nephrol. 17: 97 - 103

Eder M (1977):

Pathologie des Wachstums und der Differenzierung. In: Eder M. und Gedigk P.

(Hrsg.): Lehrbuch der allgemeinen Pathologie und pathologischen Anatomie, Springer, Berlin-Heidelberg-New York (1977) S. 207 - 270

Literaturverzeichnis

English MW, Skinner R, Pearson AD, Price L, Wyllie R und Craft AW (1997):

The influence of ifosfamide scheduling on acute nephrotoxicity in children.

Br. J. Cancer 75: 1356 - 1359

Fanconi G (1931):

Die nichtdiabetischen Glykosurien und Hyperglykämien des älteren Kindes.

Jahrb. Kinderheilkd. 133: 257 - 300

Fischer D, Kissel T, Klotz U, Schmidt H und Schwab M (2006):

Allgemeine Pharmakologie und Toxikologie. In: Estler CJ und Schmidt H (Hrsg.):

Pharmakologie und Toxikologie, Schattauer, Stuttgart-New York (2006) S. 1 - 66

Fiske CH und Subbarow Y (1925):

The colorimetric determination of phosphorus.

J. Biol. Chem. 66: 375 - 400.

Foreman JW, Bowring MA, Lee J, States B und Segal S (1987):

Effect of cystine dimethylester on renal solute handling and isolated renal tubule transport in the rat: a new model of the Fanconi syndrome.

Metabolism 36: 1185 - 1191

Furlanut M und Franceschi L (2003):

Pharmacology of ifosfamide.

Oncology 65: 2 - 6

Garcia AA (1995):

Ifosfamide-induced Fanconi syndrome.

Ann. Pharmacother. 29: 590 - 591

Literaturverzeichnis

Gedigk P und Totović V (1977):

Zell und Gewebsschäden. In: Eder M. und Gedigk P. (Hrsg.): Lehrbuch der allgemeinen Pathologie und pathologischen Anatomie, Springer, Berlin-Heidelberg-New York (1977) S. 1 - 68

Germann N, Urien S, Rodgers AH, Ratterree M, Struck RF, Waud WR, Serota DG, Bastian G, Jursic BS und Morgan LR (2005):

Comparative preclinical toxicology and pharmacology of isophosphoramidate mustard, the active metabolite of ifosfamide.

Cancer Chemother. Pharmacol. 55: 143 - 151

Gonick HC, Indraprasit S, Rosen VJ, Neustein H, Van de Velde R und Raghavan SRV (1980):

Experimental Fanconi syndrome. III. Effect of cadmium on renal tubular function, the ATP-(sodium-potassium)-dependent-ATPase transport system and renal tubular ultrastructure.

Miner. Electrolyte Metab. 3: 21 - 35

Gornall AG, Bardawill JC und David MM (1949):

Determination of serum proteins by means of the biuret reaction.

J. Biol. Chem. 177: 751 - 766

Heinegard D und Tiderstrom G (1973):

Determination of serum creatinine by a direct colorimetric method.

Clin. Chem. Acta 43: 305 - 310

Heney D, Lewis IJ und Bailey CC (1989):

Acute ifosfamide-induced tubular toxicity.

Lancet 2: 103 - 104

Literaturverzeichnis

Hofmann W, Edel HH, Guder WG, Ivandic M und Scherberich JE (2001):
Harnuntersuchungen zur differenzierten Diagnostik einer Proteinurie.
Dtsch. Ärztebl. 98: A756 - A763

Hsu CH, Patel SR und Young EW (1999):
New phosphate binding agents: ferric compounds.
J. Am. Soc. Nephrol. 10: 1274 - 1280

Izzedine H, Launay-Vacher V, Isnard-Bagnis C und Deray G (2003):
Drug-induced Fanconi's syndrome.
Am. J. Kidney Dis. 41: 292 - 309

Jaffé M (1886):
Über den Niederschlag, welchen Pikrinsäure in normalem Harn erzeugt und über eine
neue Reaktion des Kreatinins.
Z. Physiol. Chem. 10: 31 - 400

Jockenhövel F (1997):
Nierenfunktion, Wasser- und Elektrolythaushalt. In: Hick C und Hick A (Hrsg.):
Physiologie, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart-Jena-Lübeck-Ulm (1997): S. 193 - 219

Kadish AH und Hall DA (1965):
A new method for the continuous monitoring of blood glucose by measurement of
dissolved oxygen.
Clin. Chem. 11: 869 - 875

Kadish AH, Little RL und Sternberg JC (1968):
A new and rapid method for the determination of glucose by measurement of rate of
oxygen consumption.
Clin. Chem. 14: 116 - 131

Literaturverzeichnis

Kachula SO und Pentiuk OO (2004):

Effect of starvation and acetone on the enzyme systems of biotransformation and toxicity of xenobiotics: CYP2E1 substrates in rats.

Ukr. Biokhim. Zh. 76: 114 - 122

Kerbusch T, deKraker J, Keizer HJ, vanPutten JWG, Groen HJM, Jansen RLH, Schellens JHM und Beijnen JH (2001):

Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of ifosfamide and its metabolites.

Clin. Pharmacokin. 40: 41 – 62

Khayat D (2000):

The many causes of quality of life deficits in cancer patients.

Int. J. Pharmac. Med. 14 : 70 - 73

Klastersky J (2003):

Side effects of ifosfamide.

Oncology 65 Suppl 2: 7 - 10

Klinger W (1998):

Biotransformation of drugs and other xenobiotics during postnatal development.

Exp. Toxic. Pathol. 48 Suppl 1: 1 - 88

Klinger W und Müller D (1977):

Ethylmorphine N-demthylation by liver homogenate of newborn and adult rats; enzyme kinetics and age course of V_{\max} and K_m .

Acta Biol. Med. Germ. 36: 1149 - 1159

Kuhlmann U, Siegenthaler W und Siegenthaler G (1979):

Wasser- und Elektrolythaushalt. In: Siegenthaler W (Hrsg.): Klinische Pathologie, Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1979) S. 196 - 232

Literaturverzeichnis

Kuppner MC, Scharner A, Milani V, Von Hesler C, Tschop KE, Heinz O und Issels RD (2003):

Ifosfamide impairs the allostimulatory capacity of human dendritic cells by intracellular glutathione depletion.

Blood 102: 3668 - 3674

Lang F (2000):

Wasser- und Elektrolythaushalt. In: Schmidt RF, Thews G und Lang F (Hrsg.):

Physiologie des Menschen, Springer, Berlin-Heidelberg-New York (2000) S.772 - 791

Lang F und Fromm M (2000):

Niere. In: Schmidt RF, Thews G und Lang F (Hrsg.): Physiologie des Menschen,

Springer, Berlin-Heidelberg-New York (2000) S. 737 - 771

Langer T, Stohr W, Bielack S, Paulussen M, Treuner J und Beck JD (2004):

Late effects surveillance system for sarcoma patients.

Pediatr. Blood Cancer 42: 373 - 379

Lee BS, Lee JH, Kang HG, Hahn H, Lee JH, Shin HY, Ha IS, Cheong HI, Ahn HS und Choi Y (2001):

Ifosfamide nephrotoxicity in pediatric cancer patients.

Pediatr. Nephrol. 16: 796 - 799

Liu PT, Ioannides C, Shavila J, Symons AM und Parke DV (1993):

Effects of ether anaesthesia and fasting on various cytochromes P450 of rat liver and kidney.

Biochem. Pharmacol. 45: 871 - 877

Loebstein R und Koren G (1998):

Ifosfamide-induced nephrotoxicity in children: a critical review of predictive risk factors.

Pediatrics 101: E8

Literaturverzeichnis

Loebstein R, Atanackovic G, Bishai R, Wolpin J, Khattak S, Hashemi G, Gobrial M, Baruchel S, Ito S und Koren G (1999):

Risk factors for long-term outcome of ifosfamide-induced nephrotoxicity in children.
J. Clin. Pharmacol. 39: 454 - 461

Loss JF, Santos PPA, Leone L und Brunetto AL (2004):

Outcome of pediatric recurrent and refractory malignant solid tumors following ifosfamide/carboplatin/etoposide (ICE): A phase II study in a pediatric oncology centre in Brazil.
Pediatr. Blood Cancer 42: 139 - 144

Lubet RA, Mayer RT, Cameron JW, Nims RW, Burke MD, Wolff T und Guengerich FP (1985):

Dealkylation of pentoxoresorufin: A rapid and sensitive assay for measuring induction of cytochrome(s) P-450 by phenobarbital and other xenobiotics in the rat.
Arch. Biochem. Biophys. 238: 43 - 48

Lupp A, Lucas N, Lindstrom-Seppa P, Koponen K, Hanninen O, Danz M und Klinger W (1998):

Transplantation of fetal liver tissue suspension into the spleens of adult syngenic rats: effects of beta-naphthoflavone, phenobarbital and dexamethasone on cytochrome P450 isoforms expression and on glycogen storage.
Exp. Toxicol. Pathol. 50: 173 - 183

McCune DJ, Mason HH und Clarke HAT (1943):

Intractable hypophosphatemic rickets with renal glucosuria and acidosis (the Fanconi syndrome).
Am. J. Dis. Child. 65: 81 - 146

McCune JS, Friedman DL, Schuetze S, Blough D, Magbulos M und Hawkins DS (2004):

Influence of age upon ifosfamide-induced nephrotoxicity.
Pediatr. Blood Cancer 42: 427 - 432

Literaturverzeichnis

McCune JS, Risler LJ, Phillips BR, Thummel KE, Blough D und Shen DD (2005):
Contribution of CYP3A5 to hepatic and renal ifosfamide N-dechloroethylation.
Drug Metab. Dispos. 33: 1074 - 1081

McLeese J, Thiery G und Bergeron M (1996):
Maleate modifies apical endocytosis and permeability of endoplasmic reticulum
membranes in kidney tubular cells.
Cell Tissue Res. 283: 29 - 37

Mimić-Oka J und Simić T (1997):
Time course of renal glutathion levels in experimental Fanconi syndrome: an enzyme-
based approach.
Ren. Fail. 19: 373 - 381

Minassian C und Mithieux G (1994):
Differential time course of liver and kidney glucose-6-phosphatase activity during
fasting in rats.
Biochem. Mol. Biol. Int. 109: 99 - 104

Mohrmann M, Ansorge S, Schmich U, Schonfeld B und Brandis M (1994):
Toxicity of ifosfamide, cyclophosphamide and their metabolites in renal tubular cells in
culture.
Pediatr. Nephrol. 8: 157 - 163

Moncrieff M und Foot A (1989):
Fanconi syndrome after ifosfamide.
Cancer. Chemother. Pharmacol. 23: 121 - 122

Narayanan S und Appleton HD (1980):
Creatinin: a review.
Clin. Chem. 26: 1119 - 1126

Literaturverzeichnis

Negro A, Regolisti G, Perazzoli F, Davoli S, Sani C und Rossi E (1998):

Ifosfamide-induced renal Fanconi syndrome with associated nephrogenic diabetes insipidus in an adult patient.

Nephrol. Dial. Transplant. 13: 1547 - 1549

Nicolao P und Giometto B (2003):

Neurological toxicity of ifosfamide.

Oncol. 65 Suppl 2: 11 - 16

Nissim I und Weinberg JM (1996):

Glycine attenuates Fanconi syndrome induced by maleate or ifosfamide in rats.

Kidney Int. 49: 684 - 695

Nolan CV und Shaikh ZA (1992):

Lead nephrotoxicity and associated disorders: biochemical mechanism.

Toxicol. 73: 127 - 146

Norpoth K (1976):

Studies on metabolism of ifosfamide (Nsc-109724) in man.

Cancer Treat. Rep. 60: 437 - 443

Oinonen T und Lindros KO (1998):

Zonation of hepatic cytochrome P-450 expression and regulation

Biochem. J. 392: 17 – 35

Patzer L (2003):

Zellphysiologische Untersuchungen zur Wirkung der Oxazaphosphorine Ifosfamid und Cyclophosphamid sowie einiger Metabolite auf den renal tubulären Natrium-Phosphat-Kotransporter Typ IIa.

Habilitationsschrift, Medizinischen Fakultät, FSU Jena, S. 7 - 23

Literaturverzeichnis

Patzer L, Ringelmann F, Kentouche K, Fuchs D, Zintl F, Brandis M, Zimmerhackl LB und Misselwitz J (2001):

Renal function in long-term survivors of stem cell transplantation in childhood. A prospective trial.

Bone Marrow Transplant. 27: 319 - 327

Pinnell AE und Northam BE (1978):

New automated dye-binding method for serum albumin determination with bromcresol purple.

Clin. Chem. 24: 80 - 86

Pohl RJ und Fouts JR (1980):

A rapid method for assaying the metabolism of 7-ethoxyresorufin by microsomal subcellular fractions.

Anal. Biochem. 107: 150 - 155

Pratt CB (1992):

Current studies of ifosfamide for pediatric solid tumors and leukemia in the United States.

Semin. Oncol. 19: 43 - 49

Pratt CB, Meyer WH, Jenkins JJ, Avery L, McKay CP, Wyatt RJ und Hancock ML (1991):

Ifosfamide, Fanconi's syndrome and rickets.

J. Clin. Oncol. 9: 1495 - 1499

Reen RK, Melo GE und Moraes-Santos T (1999):

Malnutrition sequela on the drug metabolizing enzymes in male Holtzman rats.

J. Nutr. Biochem. 10: 615 - 618

Literaturverzeichnis

Ritz E, Andrassy K und Tschöpe W (1984):

Nierenerkrankungen. In: Schettler G (Hrsg.): Innere Medizin, Thieme, Stuttgart-New York (1984) S. 263 - 332

Ronis MJ, Huang J, Longo V, Tindberg N, Ingelman-Sundberg M und Badger TM (1998):

Expression and distribution of cytochrome P450 enzymes in male rat kidney: effects of ethanol, acetone and dietary conditions.

Biochem. Pharmacol. 55: 123 - 129

Rossi R, Pleyer J, Schafer P, Kuhn N, Kleit R, Deufel T und Jurgens H (1999):

Development of ifosfamide-induced nephrotoxicity: prospective follow-up in 75 patients.

Med. Pediatr. Oncol. 32: 177 - 182

Roth KS, Medow MS, Moses LC, Spencer PD und Schwarz SM (1989):

Renal Fanconi syndrome: development basis for a new animal model with relevance to human.

Biochim. Biophys. Acta 987: 38 - 46

Roy P, Yu LJ, Crespi CL und Waxman DJ (1999a):

Development of a substrate-activity based approach to identify the major human liver P-450 catalysts of cyclophosphamide and ifosfamide activation based on cDNA-expressed activities and liver microsomal P-450 profiles.

Drug Metab. Dispos. 27: 655 - 666

Roy P, Tretyakov O, Wright J und Waxman DJ (1999b):

Stereoselective metabolism of ifosfamide by human P-450s 3A4 and 2B6. Favorable metabolic properties of R-enantiomer.

Drug Metab. Dispos. 27: 1309 - 1318

Literaturverzeichnis

Sener G, Sehirli O, Yegen BC, Cetinel S, Gedik N und Sakarcan A (2004):

Melatonin attenuates ifosfamide-induced Fanconi syndrome in rats.

J. Pineal. Res. 37: 17 - 25

Shi C, Wang H und Liao M (2001):

Hepatotoxicity of ifosfamide on rats.

Zhongguo Gonggong Weisheng 17: 388 - 390

Skinner R (2003):

Chronic ifosfamide nephrotoxicity in children.

Med. Pediatr. Oncol. 41: 190 - 197

Skinner R, Sharkey IM, Pearson AD und Craft AW (1993):

Ifosfamide, MESNA, and nephrotoxicity in children.

J. Clin. Oncol. 11: 173 – 190

Skinner R, Pearson AD, English MW, Price L, Wyllie RA, Coulthard MG und Craft AW (1996):

Risk factors for ifosfamide nephrotoxicity in children.

Lancet 348: 578 – 580

Skinner R, Cotterill SJ und Stevens MC (2000):

Risk factors for nephrotoxicity after ifosfamide treatment in children: a UKCCSG late effects group study.

Br. J. Cancer 82: 1636 - 1645

Sladek NE (1988):

Metabolism of oxazaphosphorines.

Pharmacol. Ther. 37: 301 - 355

Literaturverzeichnis

Smolowitz RM, Hahn ME und Stegeman JJ (1991):

Immunohistochemical localization of cytochrome P-4501A1 induced by 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl and by 2,3,7,8-tetrachloro-dibenzoafuran in liver and extrahepatic tissues of the teleost *Stenotomus chrysops* (scup).

Drug Metab. Dispos. 19: 113 - 123

Spencer K (1986):

Analytic reviews in clinical biochemistry: the estimation of creatinine.

Ann. Clin. Biochem. 23: 1 - 25

Springate JE und Van Liew JB (1995):

Nephrotoxicity of ifosfamide in rats.

J. Appl. Toxicol. 15: 399 - 402

Steele TH (1982):

Interactions of starvation and selective phosphorus depletion on renal phosphate reabsorption.

Ren. Physiol. 5: 44 - 52

Thompson CS, Mikhailidis DP, Jeremy JY, Bell JL und Dandona P (1987):

Effect of starvation on biochemical indices of renal function in the rat.

Br. J. Exp. Pathol. 68: 767 - 775

Tisdale MJ (2004):

Cancer cachexia.

Langenbecks Arch. Surg. 389: 299 - 305

Ulmer HV (2000):

Ernährung. In: Schmidt RF, Thews G und Lang F (Hrsg.): Physiologie des Menschen, Springer, Berlin-Heidelberg-New York (2000): S. 792 - 805

Literaturverzeichnis

Van Schaftingen E und Gerin I (2002):

The glucose-6-phosphatase system.

Biochem. J. 362: 513 - 532

Vasiliades J (1976):

Reaction of alkaline sodium picrate with creatinine: I. Kinetics and mechanism of formation of the mono-creatinine picric acid complex.

Clin. Chem. 22: 1664 - 1671

Werner A, Dehmelt L und Nalbant P (1998):

Na⁺-dependent phosphate cotransporters: the NaPi protein families.

J. Exp. Biol. 201: 3135 - 3142

Wilke C, Sheriff S, Soleimani M und Amlal H (2005):

Vasopressin-independent regulation of collecting duct aquaporin-2 in food deprivation.

Kidney Int. 67: 201 - 216

Wuttke W (2000):

Endokrinologie. In: Schmidt RF, Thews G und Lang F (Hrsg.): Physiologie des Menschen, Springer, Berlin-Heidelberg-New York (2000) S. 370 - 407

Wyss PA, Boynton SB, Chu J, Spencer RF und Roth KS (1992):

Physiological basis for an animal model of the renal Fanconi syndrome: use of succinylacetone in the rat.

Clin. Sci. (Lond.) 83: 81 - 87

Zhou SF, Chowbay B und Changli XC (2007):

Pharmacogenetics of oxazaphosphorines and its clinical implication.

Curr. Pharmacogenomics 5: 143 - 156

Literaturverzeichnis

Zielinska E und Bodalski J (2001):

Growth retardation and osteomalacia as a result of ifosfamide nephrotoxicity in a 3-year-old boy whose genotype reveals the genes encoding glutathion S-transferases GSTM1 and GSTT1

Cytobios 106: 193 - 200

8. Anhang

8.1. Danksagung

Mein außerordentlicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. C. Fleck für die fachliche Anleitung und Strukturierung der Versuche sowie für die intensive und motivierende Betreuung.

Besonders danke ich Frau Dr. D. Appenroth für die wichtige Unterstützung bei den Tierversuchen und die wertvolle Hilfe bei der Bearbeitung des Manuskripts.

Frau PD Dr. A. Lupp danke ich recht herzlich für die wertvolle Unterstützung bei den Untersuchungen zur Biotransformation und der Morphologie.

Herrn Prof. Dr. J. Misselwitz und Herrn PD Dr. L. Patzer danke ich für ihre Zusammenarbeit bei der Knüpfung klinischer Bezüge im Rahmen meiner Promotionsarbeit.

Bei Frau A. Berthold bedanke ich mich herzlich für die freundliche Hilfe bei der Durchführung der Diureseversuche.

Den Mitarbeitern des Institutes für klinische Chemie der FSU Jena (Direktor: Herr Prof. Dr. T. Deufel) danke ich herzlich für die freundliche Unterstützung bei den Konzentrationsbestimmungen.

8.2. Angaben zur Person

Name: Werner, Tobias
Geburtsdatum: 23.06.1976
Geburtsort: Zittau

Schulbildung

September 1983 - Juli 1991	Lessingschule Zittau
September 1991 - Juli 1992	9. Oberschule Zittau
September 1992 - Juli 1996	Christian-Weise-Gymnasium Zittau
September 1993 - Juni 1994	Austauschjahr an der Horseshoe Bend Highschool / Idaho, USA

Universität

März 1998 - Februar 2002	Zahnmedizinstudium an der Albert-Ludwigs-Universität, Freiburg
März 2002 - Januar 2005	Zahnmedizinstudium an der Friedrich-Schiller- Universität, Jena

Berufliche Tätigkeit

Juli 1996 - August 1997	Zivildienst im Diakoniewerk Oberlausitz e.V. Werkstatt für Behinderte
Februar 2005 – April 2007	Assistenzzeit in allgemein Zahnärztlichen Praxen, Rheinland-Pfalz
Mai 2007 – November 2007	Arbeit an der Promotion
Seit Dezember 2007	Weiterbildungsassistent in einer Praxis für Oralchirurgie, Neuwied

8.3. Eidesstattliche Erklärung und Selbständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönliche Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Herr Prof. Dr. C. Fleck, Frau Dr. D. Appenroth, Herr Prof. Dr. T. Deufel und die Mitarbeiter des Institutes für klinische Chemie der FSU Jena, Frau PD Dr. A. Lupp, Frau A. Berthold,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und das Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Ort, Datum

Unterschrift